

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Prof. Dr. Rolf F. Maier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Mutationsanalyse des thiazidsensitiven Natrium-Chlorid-Kotransporters
im distalen Tubuluskonvoluts der Niere**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Christoph Zweyrohn aus Darmstadt
Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 28.05.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. H. Schäfer
Referent: Herr Prof. Dr. med. G. Klaus
1. Korreferent: Herr Prof. Dr. T. Plant

1	Einleitung.....	5
1.1	Hereditäre hypokaliämische Salzverlust-Tubulopathien	6
1.1.1	Historischer Hintergrund	6
1.1.2	Klinik des Gitelman Syndroms	7
1.1.3	Pathophysiologie und Genetik des Gitelman Syndroms.....	10
1.1.4	Physiologie der renalen Magnesium-Resorption	15
1.1.5	Zielsetzung.....	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Patienten.....	21
2.2	Allgemeine Materialien	21
2.2.1	Geräte und Hilfsmittel.....	21
2.2.2	Chemikalien und Reagenzien	22
2.3	DNA-Gewinnung.....	23
2.3.1	Material	23
2.3.2	Methode der DNA- Isolierung aus Vollblut	23
2.4	Gelelektrophorese	24
2.5	Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	25
2.5.1	Beschreibung.....	25
2.5.2	Chemikalien	27
2.5.3	Durchführung.....	28
2.6	SSCP (single-strand conformation polymorphism).....	31
2.6.1	Beschreibung.....	31
2.6.2	Material	33
2.6.3	Geräte.....	33
2.6.4	Chemikalien	33
2.6.5	Durchführung.....	33
2.6.6	Auswertung	34
2.7	DNA-Sequenzierung.....	35
2.7.1	Beschreibung.....	35
2.7.2	Chemikalien	37
2.7.3	Durchführung.....	39
2.7.4	Auswertung	43
2.8	Kopplungsanalyse mittels Mikrosatelliten.....	44
2.8.1	Beschreibung.....	44
2.8.2	Material	47
2.8.3	Geräte.....	47
2.8.4	Chemikalien	47
2.8.5	Durchführung.....	47
2.8.6	Auswertung	48
3	Ergebnisse	49
3.1.1	Phänotyp- Daten.....	49
3.1.2	Ergebnisse der Kopplungsanalyse	49
3.1.3	Ergebnisse der Mutationsanalyse.....	56
3.1.4	Phänotyp-Genotyp-Korrelation.....	73
4	Diskussion.....	75
4.1	Phänotyp-Analyse	75
4.2	Kopplungsanalyse	77
4.3	Mutationen im <i>SLC12A3</i> -Gen.....	77
4.3.1	Mutation S 178 E:	79
4.3.2	Mutation L 272 P:	80

4.3.3	Mutation Donor splice site Intron 9 (nucl 1208+1, G→T):	80
4.3.4	Mutation G 463 E:	80
4.3.5	Mutation W 558 R:	81
4.3.6	Mutation I 580(2) Del T→fs→STOP (AS-Pos.610):	81
4.3.7	Mutation P 643 L:	82
4.3.8	Mutation R 655 C:	82
4.3.9	Mutation G 729 V:	82
4.3.10	Mutation L 850 P:	83
4.3.11	Mutation R 955 Q:	83
4.3.12	Mutation Donor splice site intron 24 (nucl 2881+1 G→T):	84
4.3.13	Mutation R 1009(2) Del G→fs→STOP (AS-Pos 1021+4):	84
4.3.14	Zusammenfassende Beurteilung der Mutationsanalyse	85
4.4	Genotyp-Phänotyp-Vergleich	87
5	Zusammenfassung	93
6	english summary	95
7	Literaturverzeichnis	97
8	Anhang	102
8.1	Abkürzungen	102
8.2	Fragebogen	104
8.3	<i>SLC12A3</i> -Gensequenz (Genbank: NM 000339)	107
8.4	akademische Lehrer	109
8.5	Danksagung	109

1 Einleitung

Der menschliche Organismus reagiert sensibel auf Veränderungen des Elektrolyt- und Volumenhaushalts. Dessen exakte Regulierung ist essentiell für normale neuromuskuläre Funktion, Sauerstofftransport und Energietransfer an das Gewebe. Die Niere ist das zentrale Organ für die Volumen- und Elektrolyt-Homöostase. Basis des transzellulären Elektrolyt- und Wassertransports sind Ionen-Kanäle, Transporter und energieabhängige Pumpen. Sie sind selektiv auf verschiedenen Ebenen des Tubulusapparates exprimiert und in der Tubulusepithelzelle selbst polar orientiert. Eine Vielzahl monogener Nierenerkrankungen, die auf Defekten einzelner Tubulusproteine beruhen, gibt Einblick in diese Regulationswege und hat zum Verständnis der Nierenphysiologie bzw. deren Pathophysiologie beigetragen. Zu ihnen gehören die angeborenen renalen Salzverlust-Erkrankungen mit sekundärer Hypokaliämie, ursprünglich subsumiert unter dem Begriff Bartter-Syndrom. Die Erkrankungen präsentieren sich je nach betroffenem Tubulussegment bzw. Transportprotein mit verschiedenen klinischen Erscheinungsbildern. Gemeinsames Merkmal und primäres pathophysiologisches Ereignis ist eine gestörte Natrium-Chlorid (NaCl)- Rückresorption aus dem Tubuluslumen. Es folgt eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und sekundäre, hypokaliämische metabolische Alkalose.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf dem Gitelman-Syndrom. Ursache ist eine Störung der renalen NaCl-Rückresorption im distalen Tubulus. Neben der hypokaliämischen Alkalose ist eine Koinzidenz von Hypomagnesiämie und Hypokalziurie pathognomonisch. Molekulare Ursache sind Mutationen im *SLC12A3*-Gen, das den thiazidsensitiven Natrium-Chlorid-Kotransporter im distalen Tubulus kodiert. Bislang galt das Gitelman-Syndrom als genetisch homogene Erkrankung, jüngere Beobachtungen stellten die genetische und klinische Homogenität allerdings in Frage. In der vorliegenden Untersuchung soll an einem Patientenkollektiv mit renalem hypokaliämischem Salzverlust nach weiteren Hinweisen für eine mögliche Heterogenität des Gitelman-Syndroms gesucht werden.

1.1 Hereditäre hypokaliämische Salzverlust-Tubulopathien

1.1.1 Historischer Hintergrund

Der amerikanische Endokrinologe Frederic Bartter beschrieb 1962 zwei Patienten mit hypokaliämischer Alkalose, normotensivem Hyperaldosteronismus und Hypertrophie des juxtaglomerulären Apparates der Niere. Ätiologisch nahm er ein vermindertes Ansprechen des vaskulären Apparates auf Angiotensin II an [4]. Vier Jahre später beschrieb Gitelman drei hypokaliämische Patienten, die sich zusätzlich durch niedrige Serum-Magnesium-Konzentrationen auszeichneten [30]. Leitsymptome sind muskuläre Schwäche, Tetanien und Karpopedalspasmen sowie ein positives Chvostek-Zeichen. Mehr als 20 Jahre nach der Erstbeschreibung wird eine verminderte renale Kalzium-Ausscheidung als weiteres typisches Merkmal dieser Erkrankung erkannt. Die Koinzidenz von Hypokalziurie und Hypomagnesiämie bei gleichzeitig bestehender hypokaliämischer Alkalose wird fortan als Gitelman-Syndrom definiert [7].

McCredie et al. [55] und Ohlson [60] grenzten in den 70er und 80er Jahren eine weitere Entität mit hypokaliämischer Alkalose ab, die sich in einigen Facetten von den beiden früher beschriebenen Krankheitsbildern wesentlich unterscheidet. Die Erkrankung manifestiert sich pränatal durch ein Polyhydramnion, die Patienten sind allesamt Frühgeborene, ihre Neonatalperiode ist kompliziert durch massive Polyurie. Dieses Krankheitsbild wurde damals als antenatale Variante des Bartter-Syndroms (aBS) angesehen. Im Gegensatz zum Gitelman-Syndrom ist die renale Kalzium-Ausscheidung erhöht, typischer radiologischer (später sonographischer) Befund ist eine medulläre Nephrokalzinose [40,60]. Seyberth et al. ergänzten als weiteres typisches Merkmal die erhöhte renale Prostaglandin E₂-Exkretion und leiteten damit einen Durchbruch in der Therapie dieser Erkrankung ein. Um die Bedeutung der Prostaglandin-E₂-Überproduktion für den Krankheitsverlauf dieser Entität hervorzuheben, führten sie den Begriff des Hyperprostaglandin-E-Syndroms (HPS) ein, das sie dem Bartter-Gitelman-Syndrom gegenüberstellten [81]. Primäre Ursache und Pathophysiologie beider Entitäten wurden bis Mitte der 90er Jahre kontrovers diskutiert. Hilfreich in der Aufklärung der molekularen Ursache der Erkrankung waren Expositionsversuche mit Diuretika mit bekanntem Wirkort. Patienten mit Gitelman-Syndrom zeigten eine Resistenz auf die Wirkung der Thiazid-Diuretika [89], hingegen blieb bei Patienten mit HPS der saluretische Effekt des

Furosemids aus [39]. Bald darauf wurden Mutationen in den Zielmolekülen beider Diuretika als primäre molekulare Ursache der renalen Salzverlust-Erkrankungen mit sekundärer Hypokaliämie entdeckt.

1.1.2 Klinik des Gitelman Syndroms

Patienten mit Gitelman-Syndrom (GS) wurden in der Vergangenheit oft als asymptomatisch angesehen, nicht zuletzt deshalb, weil ihre Einschränkungen sehr unspezifischen Charakter haben. Häufig klagen die Patienten über Müdigkeit, muskuläre Schwäche und Dysthymien. Mehr noch können Tetanien, Karpopedalspasmen und Parästhesien auf die primäre Ätiologie, die Elektrolyt-Störung hinweisen [16]. Im pädiatrischen Klientel können Enuresis und Kleinwuchs zur frühen Diagnose führen, häufiger aber wird die Erkrankung zufällig durch die Persistenz der Hypokaliämie im Anschluss an interkurrente, vor allem gastrointestinale Infekte diagnostiziert. In einem allerdings durch die pädiatrische Ausrichtung der Autoren selektioniertem GS-Kollektiv waren die Patienten bei Diagnosestellung im Median 6 Jahre alt [7].

Gerade weil die Krankheitssymptome unspezifisch sind und einen schleichenden Charakter haben, wird die Erkrankung in aller Regel erst durch die Laboruntersuchung diagnostiziert, welche die typische Konstellation aus Hypokaliämie und Hypomagnesiämie aufdeckt. Polyurie und Polydipsie sind nur mild ausgeprägt [6], die renale Konzentrationsfähigkeit ist nicht relevant kompromittiert. Die Daten zum Längenwachstum von GS-Patienten sind widersprüchlich, die Inzidenz von Kleinwuchs bei Diagnosestellung variiert von 8% [30] über 30% [73] bis hin zu 60% [7]. Bettinelli beschrieb einen Fall mit koinzidenter *empty sella* und einem konsekutiven absoluten Wachstumshormon-Mangel [5]. Gelenksbeschwerden, hervorgerufen durch eine Chondrokalzinose, wurden im Erwachsenenalter beobachtet [88]. Gefragt nach ihrer jeweiligen subjektiv empfundenen Beeinträchtigung hält ungefähr die Hälfte der Patienten ihre Krankheitssymptome für moderat bis schwer und sieht sich dementsprechend in ihrer Lebensqualität eingeschränkt [17]. Der Eingriff in die Lebensqualität ist damit dem von Diabetikern oder Patienten mit koronarer Herzkrankheit vergleichbar.

Das Fehlen von Polyhydramnion, Frühgeburtlichkeit und Nephrokalzinose sowie normale renale Prostaglandin-Exkretion bieten wichtige differentialdiagnostische Merkmale zur Unterscheidung von den anderen hypokaliämischen Salzverlust-Tubulopathien (HSLT) [40,50,63,64,71] (siehe Tab 1-1).

Folgende laborchemische Konstellation gilt als charakteristisch für das GS: die Kombination von Hypokaliämie $< 3,6 \text{ mmol/l}$ (mit einer renalen fraktionellen Exkretion (FE) für Kalium $>16\%$), Hypomagnesiämie $<0,65 \text{ mmol/l}$ ($\text{FE}_{\text{Mg}} >4\%$) und Hypokalziurie (molarer Kalzium/Kreatinin-Quotient im Urin $< 0,1$), bei gleichzeitig bestehendem normotensivem Hyperreninismus und Hyperaldosteronismus [7].

Mehr und mehr wird allerdings in Frage gestellt, dass es sich beim GS um eine klinisch und genetisch homogene Erkrankung handle.[36,91,100] Bei einigen Patienten mit *SLC12A3*-Mutationen (die mit dem GS assoziiert sind) fehlt die Koinzidenz von Hypomagnesiämie und Hypokalziurie oder ist nur transitorisch nachweisbar [3,74]. Hingegen weisen einige Patienten mit Mutationen im renalen Chlorid-Kanal CLC-Kb, die primär mit dem klassischen Bartter-Syndrom (cBS) assoziiert sind, eben diese Dissoziation von renalem Kalzium- und Magnesium-Handling auf [36,91].

Gemeinhin ist aber die klinische Präsentation der cBS-Patienten am heterogensten. Sie reicht auch hier von einer vermeintlich asymptomatischen Verlaufsform bis hin zur schweren Elektrolytentgleisung im frühen Säuglingsalter. Etwa die Hälfte der Patienten wird bereits vor Abschluss des ersten Lebensjahres diagnostiziert [63]. Die Symptome reichen von Müdigkeit, Adynamie, muskulärer Schwäche bis hin zur Gedeihstörung. Der Serum-Kalium-Nadir liegt zwischen $1,5$ und $2,5 \text{ mmol/l}$ und tritt zusammen mit metabolischer Alkalose, normotensivem Hyperreninismus und Hyperaldosteronismus auf [63,71]. Eine Hypomagnesiämie besteht bei einem Drittel der Patienten [13,67,71]. Die fraktionelle Ausscheidung von Kalium und Chlorid im Urin ist erhöht, während die renale Kalzium-Ausscheidung häufig normal ist, in Einzelfällen aber Hyper- oder auch Hypokalziurien beobachtet wurden. Die meisten cBS-Patienten sind jedoch normokalziurisch. Die Ausscheidung von Prostaglandin- E_2 und seiner Metabolite im Urin ist erhöht. Daten zum Verlauf der glomerulären Nierenfunktion beim cBS sind kaum publiziert. Nicht oder unzureichend behandelt führen chronische Hypokaliämie, Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems sowie die Kontraktion des Extrazellulärvolumens zu tubulointerstitieller Schädigung (Vakuolenbildung im proximalen Tubulus sowie interstitielle Fibrose) und konsekutiv zur Einschränkung der glomerulären Filtration [63,71,94].

Die variable Manifestation des cBS erschwert im klinischen Alltag gelegentlich die Abgrenzung zu dem GS (siehe Tab 1-1) [63,64]. Leichter hingegen gelingt die Abgrenzung beider Erkrankungen von der schwersten Form der HSLT, dem Hyperprostaglandin-E-Syndrom (antenatales Bartter-Syndrom [HPS/aBS]). Diese Patienten sind extrem polyurisch. Bereits pränatal führt die fetale Polyurie zu Polyhydramnion und Frühgeburtlichkeit

[1,40,55,64]. Postpartal können Polyurie und gesteigerte Saliurese zu lebensbedrohlicher Dehydratation führen. Die exzessiv erhöhte Prostaglandin-Synthese aggraviert den renalen Salzverlust und führt zu weiteren systemischen Symptomen wie Fieber und Erbrechen [40,66,81]. Neben der für alle HSLT charakteristischen hypokaliämischen Alkalose besteht typischerweise eine Hyperkalziurie mit konsekutiver medullärer Nephrokalzinose. Mit dem Vorbehalt, dass bisher wenig dazu publiziert wurde, scheint die glomeruläre Nierenfunktion bis in das Erwachsenenalter hinein nur wenig beeinträchtigt. Lediglich eine genetisch wie klinisch abgrenzbare Subpopulation entwickelt in der Adoleszenz eine chronisch progrediente Niereninsuffizienz. Diese Patienten leiden zusätzlich unter Innenohrtaubheit [9,35,44,78,93].

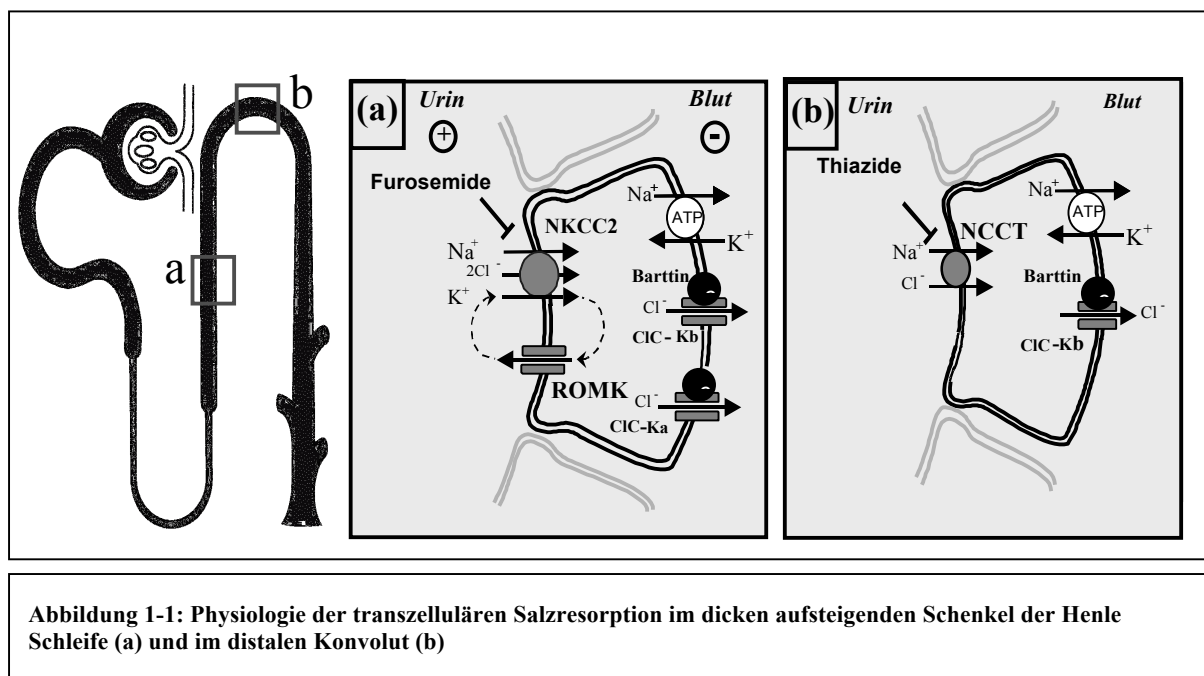
Tabelle 1-1 Differentialdiagnose der hereditären Salzverlust-Tubulopathien (+ Merkmal vorhanden; - Merkmal nicht vorhanden; ↑ erhöht; ↓ erniedrigt; ↔ normal)

	Gitelman Syndrom	klassisches BS	HPS/aBS
Manifestationsalter	Kindes- bis Erwachsenalter	Säuglings- Kindesalter	pränatal
Polyhydramnion/Frühgeburtlichkeit	-	(-)	+
Neonatale Polyurie	-	(-)	+
Wachstumsretardierung	(+)	+	+
Nephrokalzinose	-	-	+
Tetanie	+	-	-
muskuläre Schwäche	+	+	+
metabolische Alkalose	+	+	+
Hypokaliämie	+	+	+
Hypomagnesiämie	+	(-)	-
Chlorid- Ausscheidung	↑↑	↑↑↑	↑↑
Kalzium-Ausscheidung	↓	↑ ↔ ↓	↑↑
Harnkonzentrierung	↔	↓	↓↓↓
Hyperrenin/Hyperaldosteronismus	(-)	+	++
Hyperprostaglandinurie	-	+	++

1.1.3 Pathophysiologie und Genetik des Gitelman Syndroms

Die laborchemischen Veränderungen der GS- bzw. HPS/aBS-Patienten ähneln den Auswirkungen chronischen Diuretikagebrauchs (Thiazid- bzw. Schleifendiuretika). Diese Beobachtung war hilfreich bei der Auswahl geeigneter Kandidatengene, die sich auf die Zielmoleküle dieser Substanzen konzentrierten. Um Identität und Funktion dieser Targetproteine zu verstehen, ist es sinnvoll, die transepitheliale Salzresorption in den jeweiligen Tubulusabschnitten zu rekapitulieren. Basis unserer Vorstellung von der Salzresorption sind frühe elektrophysiologische Arbeiten von Greger et al. [31], ergänzend kam die Aufklärung monogener Tubuluserkrankungen im Lauf der letzten Dekade hinzu. Die Triebfeder für die Natrium-Chlorid-(NaCl)-Resorption sowohl im dicken, aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife (TAL) als auch im distalen Tubuluskonvolut (DCT) ist die in der basolateralen Membran lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase. Diese generiert einen elektrochemischen Gradienten für Natrium von extra- nach intrazellulär. In der Folge können im TAL Natrium, Kalium und Chlorid-Ionen über den furosemidsensiblen Kotransporter NKCC2 in die Tubuluszelle sekundär aktiv einströmen (Abb.1-1a). Eine weitere Voraussetzung für die Funktion des Kotransporters ist ein ständiges Rezirkulieren von Kalium-Ionen aus dem Tubuluslumen über den koexprimierten apikalen Kaliumkanal ROMK [34,38,40,84,95]. Während Natrium-Ionen die Tubuluszelle über die Na^+/K^+ -ATPase in den interstitiellen Raum („Blutseite“) verlassen, folgt Chlorid über basolaterale Chloridkanäle (CLC-Ka und CLC-Kb). Bedingt durch die transzelluläre Chlorid-Passage wird über dem Tubulusepithel eine lumenpositive elektrische Spannung aufgebaut, welche die jetzt parazelluläre Resorption divalenter Kationen ermöglicht [25,67].

Im distalen Tubulus (Abb. 1-1b) findet die Salzresorption prinzipiell ähnlich statt. Der NaCl-Übertritt über die luminale Membran wird hier durch den thiazidsensitiven NaCl-Kotransporter (NCCT) geleistet. Im Unterschied zum TAL fehlt allerdings der Symport mit Kalium.



Sistiert die luminal Kochsalz-Resorption via NCCT, so erhöht sich die NaCl-Konzentration in den weiter distalen Tubulusabschnitten, die aber nur noch eine geringe Transportkapazität insbesondere für Chlorid-Ionen besitzen. Die Folge ist eine kritische Salzdepletion. Die Kontraktion des Extrazellulärvolumens aktiviert das Renin-Aldosteron-Angiotensin-System (RAAS). Aldosteron steigert gemeinsam mit der erhöhten luminalen Na-Last die Natriumrückresorption im Sammelrohr im Austausch gegen Kalium- und Wasserstoff-Ionen. Folge ist die typische hypokaliämische Alkalose [40]. Beim phänotypisch ja nicht unähnlichen cBS wird die Chlorid-Depletion durch den Funktionsverlust des basolateralen Chlorid-Kanals in der Henle-Schleife und dem distalen Tubulus verursacht [86]. Da mit dem strukturverwandten CLC-Ka ein zweiter Chloridkanal in der basolateralen TAL-Membran exprimiert ist, kann der Chloridverlust im TAL-Segment partiell ausgeglichen werden, während dies im DCT nicht gelingt. Fallen gleich beide Chloridkanäle (CLC-Ka und -Kb sind auch im Innenohr exprimiert) aus, resultiert daraus der schwerste Krankheitsverlauf des aBS/HPS in Kombination mit Schwerhörigkeit (BSND) [78]. Beim HPS/aBS ist der Ausfall des luminalen Natrium-Kalium-2Chlorid-Kotransporters (NKCC2) bzw. des apikalen Kalium-Kanals (ROMK) für Polyurie und gesteigerte Saliurese ursächlich [40] (siehe Abb 1-1a).

Die differenzierte Betrachtung der verschiedenen HSLT-Phänotypen und ihre Assoziation zu den genannten Genen bzw. Genprodukten im Tubulusapparat resultiert überwiegend aus

Untersuchungen in der zweiten Hälfte der 1990-er Jahre. Tabelle 1-2 fasst die Zuordnungen zusammen.

Syndrome	Vererbungsmodus	Genlokalisierung	Gen	Genprodukt
Gitelman-Syndrom	autosomal-rezessiv	16q13	<i>SLC12A3</i>	Na-Cl-Kotransporter (NCCT)
klassisches Bartter-Syndrom	autosomal-rezessiv	1p36	<i>CLCNKB</i>	renaler Chlorid-Kanal ClC-Kb
HPS/aBS	autosomal-rezessiv	15q15-21	<i>SLC12A1</i>	Na-K-2Cl-Kotransporter (BSC1,NKCC2)
HPS/aBS	autosomal-rezessiv	11q24-25	<i>KCNJ1</i>	renaler Kalium-Kanal ROMK
aBS mit Innenohrtaubheit (BSND)	autosomal-rezessiv	1p32.3	<i>BSND</i>	Chloridkanal-Regulator (Barttin)
aBS mit Innenohrtaubheit (BSND)	autosomal-rezessiv	1p36	<i>CLCNKA</i> <i>CLCNKB</i>	Chloridkanäle CLC-Ka und – Kb (Niere, Innenohr)

Tabelle 1-2 Genetik der hereditären Salzverlust-Tubulopathien (HSLT)

Der Weg der molekularen Aufklärung des GS sei an dieser Stelle näher skizziert. Die Elektrolytkonstellation von GS-Patienten ähnelt der von Patienten, die chronisch Thiazide einnehmen [7]. Das Ausbleiben einer erhöhten Chloridausscheidung nach Thiazidgabe und die forcierte Saliurese nach Furosemid-Substitution bekräftigen, dass es sich beim GS um einen Defekt im distalen Tubulus handelt [39,89]. Der NCCT als Zielmolekül der Thiazid-Diuretika war damit ein attraktives Kandidateng für die Aufklärung des GS. In Nagern wird NCCT-mRNA selektiv im distalen Tubuluskonvolut synthetisiert [27,59]. Simon [85] und Mastroianni et al. [52] klonierten gleichzeitig humane NCCT cDNA, welche ein Polypeptid aus 1021 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 112 KDa kodiert. Löslichkeitsanalysen ergaben eine anzunehmende Primärstruktur aus drei Hauptdomänen [26,27]: jeweils zwei hydrophile intrazelluläre N- und C-terminale Domänen und einen

mittleren hydrophoben Bereich, bestehend aus 12 transmembranösen Domänen (siehe Abb.1-2).

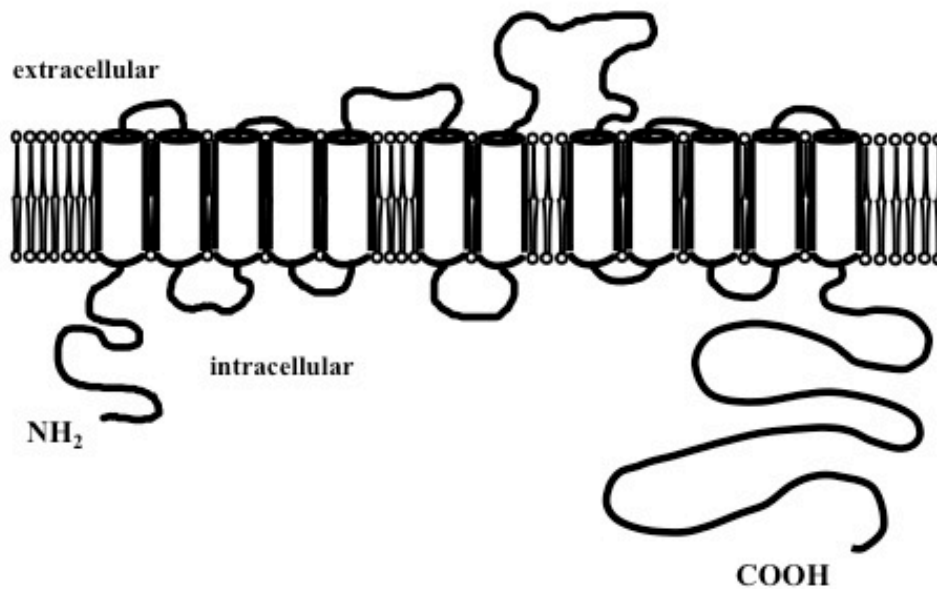


Abbildung 1-2 Strukturmodell NCCT-Molekül

Die Intron-Exon-Organisation zeigt, dass das *SLC12A3*-Gen aus 26 Exonen besteht. Der humane NCCT zeichnet sich durch eine hochgradige Homologie mit anderen Vertretern der Familie der elektroneutralen Kation-Chlorid-Kotransporter aus [24,26]. Mastroianni et al. kartierten das Gen auf Chromosom 16q13 [52]. Simon et al. zeigten an 30 Patienten aus 12 Familien die Kopplung zwischen GS und dem NCCT-Locus [85]. Es folgte die Beschreibung einer Vielzahl von Mutationen im NCCT, die alle mit dem GS-Phänotyp kosegregierten [16,17,46,53,85,90,98]. Die Transmission der Erkrankung ist uniform autosomal-rezessiv. Die Heterozygoten-Frequenz wird in Europa auf ein Prozent geschätzt [20,37]. Die zahlreichen Mutationen verteilen sich über das gesamte Protein, wobei eine Konzentrierung im C-Terminus konstatiert wurde [46]. Dieser gilt als hochkonservierter Teil des NCCT und bietet

mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen, welche eine Rolle in der Modifizierung bzw. Regulierung der Transportaktivität des NCCT spielen dürften [21,46]. Zwei Drittel der Mutationen sind Basensubstitutionen [37,46]. Die funktionelle Expression von einigen *SLC12A3*-Mutationen in *Xenopus*-Oozyten zeigt, dass dem Funktionsverlust überwiegend eine Retention der Mutanten im endoplasmatischen Retikulum zugrunde liegt. Man vermutet, dass die Mutationen zu einer defekten Proteinfaltung führen und die Proteine somit von der Qualitätskontrolle des endoplasmatischen Retikulums aussortiert und der Degradation zugeführt werden. Die Annahme einer defekten Prozessierung des Proteins wird gestützt durch die Beobachtung, dass viele Mutanten ein verändertes Glykosilierungsmuster aufweisen [43]. Jüngere Expressionsstudien weisen aber auch auf Mutationen mit normaler Glykosilierung hin. Diese Proteine erreichen die apikale Zellmembran, zeigen dort aber nur eine reduzierte oder keine intrinsische Transportaktivität für Natrium und Chlorid [73].

1.1.4 Physiologie der renalen Magnesium-Resorption

Kardinalsymptom des Gitelman-Syndroms ist die Hypomagnesiämie. Der Gedanke lag nahe, aus klinischer Beobachtung der GS-Patienten Erkenntnisse über Regulation des Mg-Haushalts zu gewinnen. Die Erforschung weiterer monogenen Erkrankungen mit renalem Mg-Verlust ergänzten unser heutiges Verständnis der Magnesium-Homöostase.

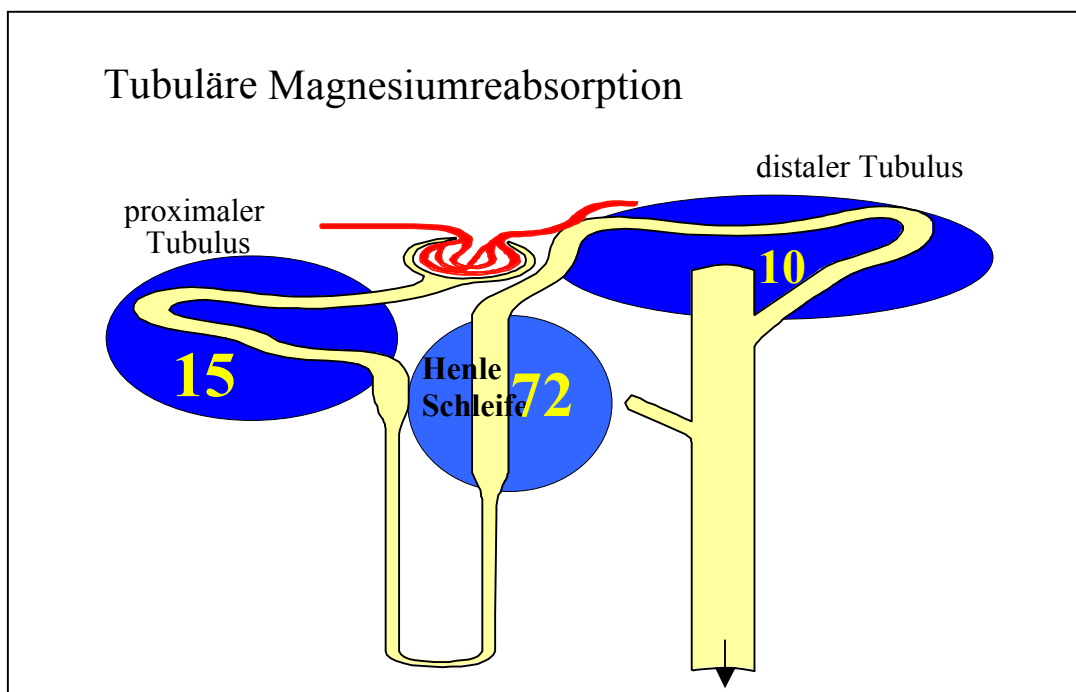
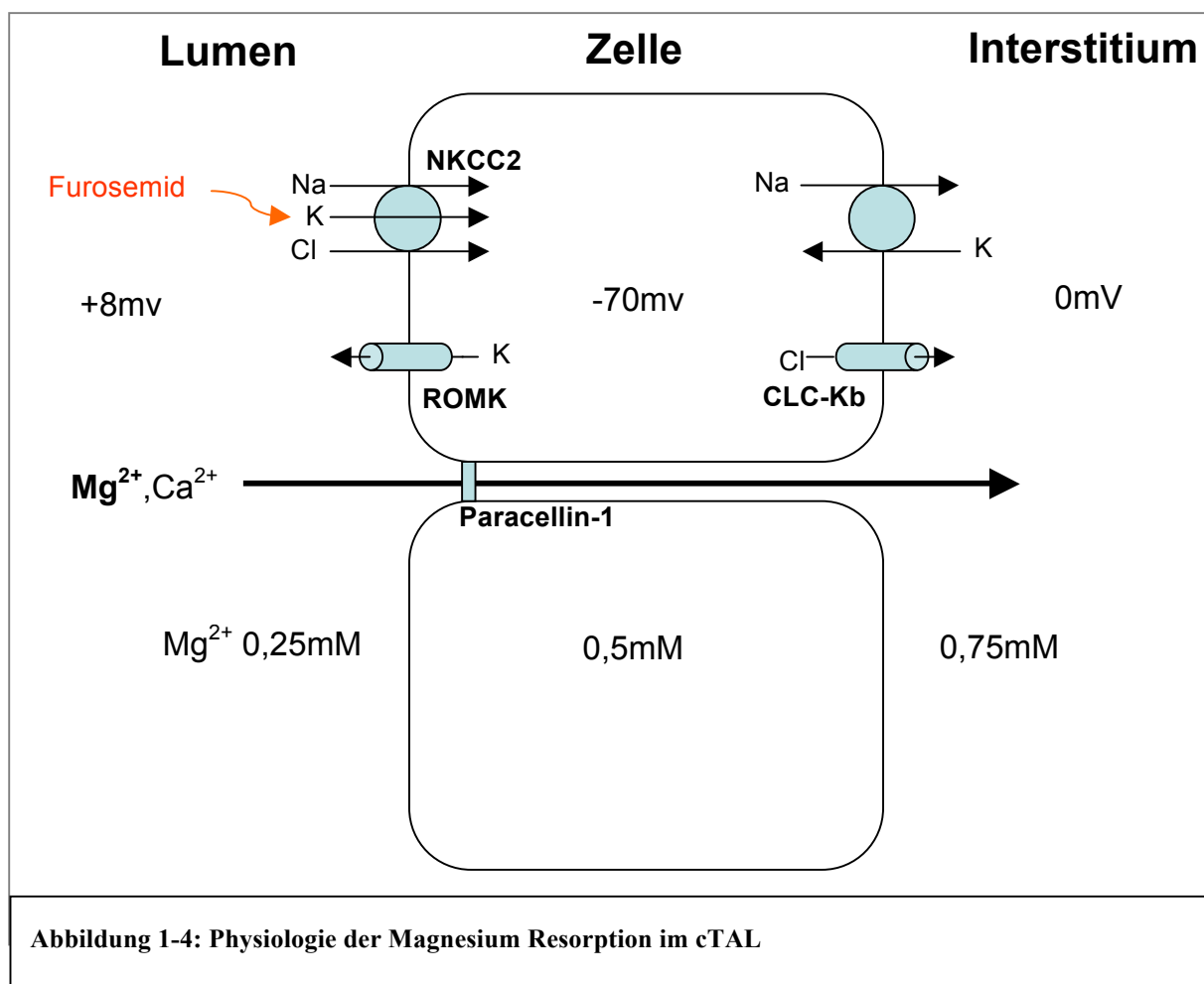


Abbildung 1-3: tubuläre Magnesiumresorption (x%Resorption Mg des Ultrafiltrats)

Wieder sind die Nieren zentrale Schaltstelle. Ungefähr 80% des Plasma-Mg werden glomerulär filtriert. Im proximalen Tubulus werden 15%, in den kortikalen Segmenten des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife (cTAL) wenig mehr als 70% des filtrierten Mg resorbiert. Die übrigen 10-15% des filtrierten Mg erreichen den distalen Tubulus, von ihnen können wiederum bis zu 80% aufgenommen werden. Der DCT ist Ort der Feinjustierung der renalen Mg-Ausscheidung und damit Schlüsselement der Mg-Homöostase. Normalerweise erscheinen weniger als 5% des filtrierten Mg im Urin (siehe Abb.1-3). Bisher konnte in keinem Nephronabschnitt Mg-Sekretion beobachtet werden; es gilt, dass die Mg-Homöostase allein über eine Änderung der renalen Resorption kontrolliert wird [13,67].

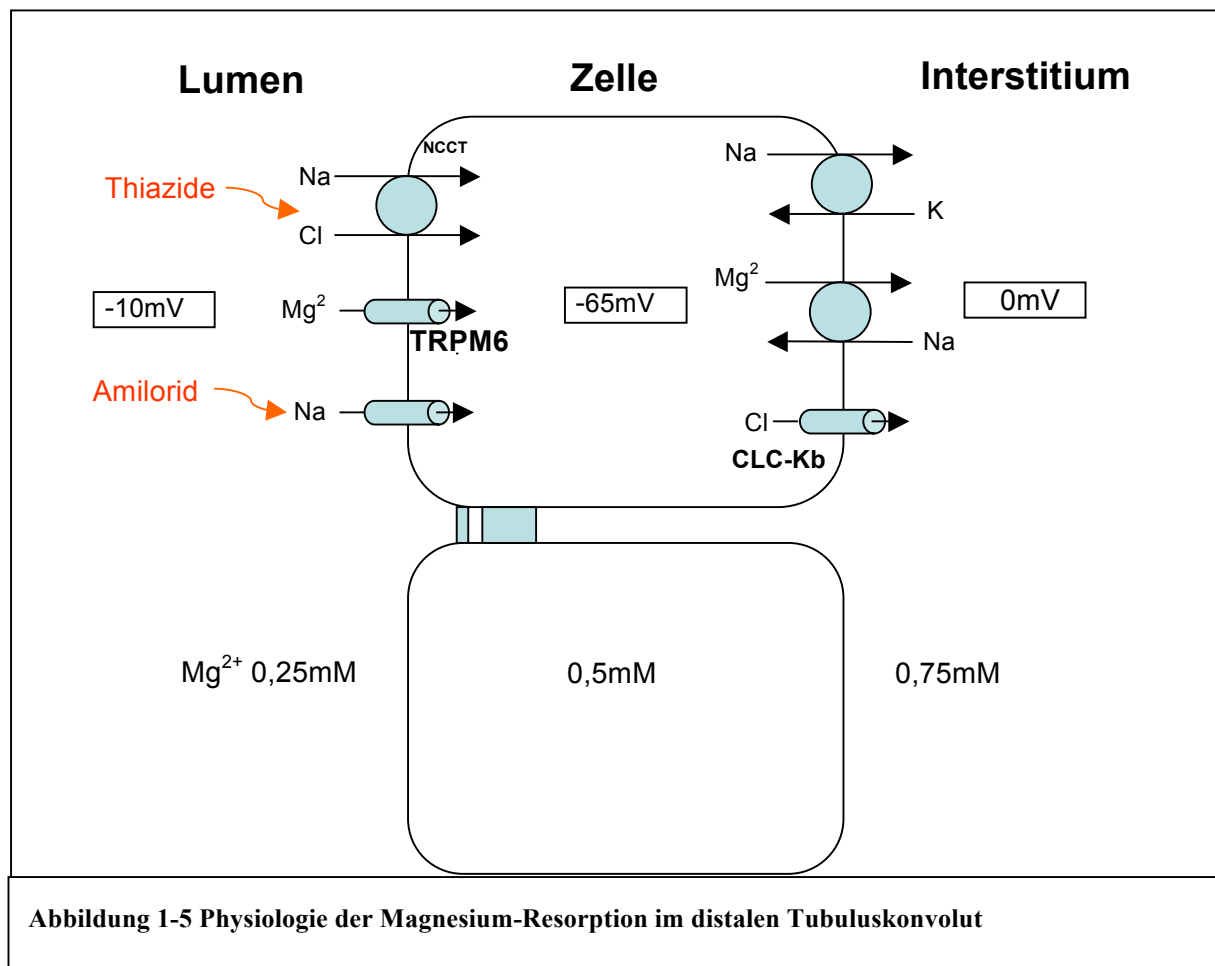
Die Mg-Resorption unterliegt einem ontogenetischen Reifungsprozess. In der Neonatalzeit werden noch 70% des filtrierten Mg im proximalen Tubulus resorbiert, was durch die Unreife

des Schlussleistungssystems erklärt wird [45]. Angeborene Störungen der Mg-Resorption im distalen Tubulus können daher in der Neugeborenenperiode noch maskiert sein. Jenseits der Neonatalzeit ist Hauptresorptionsort für Magnesium der cTAL. Die Resorption findet hier parazellulär und passiv statt. Triebkraft ist das lumenpositive Potential, das durch die transzelluläre Chlorid-Resorption generiert wird (siehe Abb.1-4)[67]. Die Permeabilität des parazellulären Pfades wird durch die elektrische Ladung der Proteine des Schlussleistungssystems bestimmt. Eines dieser Proteine, Paracellin-1 bzw. Claudin-16, ist maßgeblich an der Kontrolle der parazellulären Ca/Mg-Resorption beteiligt. Inaktivierende Mutationen im Paracellin-1-Gen führen zu dem Krankheitsbild der *familiären Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose* (FHHNC), bei der es zu einem gravierenden renalen Kalzium- und Magnesiumverlust kommt [87]. Außer von den die Permeabilität des parazellulären Pfades bestimmenden Faktoren hängt der Transport divalenter Kationen von der transepithelialen Spannung ab. Beim HPS/aBS kann aufgrund der defekten NaCl-Resorption kein lumenpositives Potential entstehen, was die zu beobachtende Hyperkalziurie des Krankheitsbildes erklärt. Hingegen weist nur ein Drittel der Patienten einen renalen Mg-Verlust auf. Die Mehrheit der Betroffenen kann offensichtlich Resorptionswege in anderen Tubulussegmenten rekrutieren, wahrscheinlich im DCT durch up-Regulation der an die gesteigerte NaCl Resorption geknüpften Mg-Transporter [13,67].



Der Mg-Transport im distalen Tubuluskonvolut erfolgt transzellulär und aktiv gegen seinen Konzentrationsgradienten (Mg-Konzentration luminal: 0,25 mM; intrazellulär: 0,5 mM; Interstitium: 0,75 mM) [69,82]. Wegen des dichten Schlussleistennetzes und des lumennegativen Potentials ist eine parazelluläre Mg-Resorption im DCT nicht möglich [69]. Es wird angenommen, dass Mg durch einen spezifischen apikalen Kanal in die Tubuluszelle sekundär aktiv eintritt. Der notwendige Mg-Gradient wird an der basolateralen Membran generiert durch das Zusammenspiel von Na/K-ATPase und einem Na/Mg-Exchanger, der Mg im Austausch gegen Na⁺ in das Interstitium entlässt [92]. Mit der erst kürzlich geglückten molekularen Entschlüsselung einer seltenen schweren renalen Mg-Verlust-Erkrankung, *Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalzämie*, gelang es, die Identität des bis dahin postulierten apikalen Mg-Kanals zu beweisen [77]. Der Kanal erhielt die Bezeichnung TRPM6. Außer im DCT wurde seine Expression auch im Dünndarm nachgewiesen, so dass TRPM6 auch eine Rolle bei der enteralen Mg Resorption zufällt. Durch insuffiziente intestinale Resorption nimmt der Mg-Mangel bei Trägern von TRPM6 Mutationen noch zu.

Warum es beim GS zum renalen Mg-Verlust kommt, ist weiterhin nicht vollständig geklärt. Mehrere Hypothesen zur Pathophysiologie werden diskutiert: Manche Autoren sehen in dem renalen Mg-Verlust eine Folge der Hypokaliämie bzw. Kaliumdepletion beim GS. In der Tat haben In-vitro-Untersuchungen an isolierten DCT-Zellen in einer kaliumdepletierten Nährlösung eine verminderte Mg-Aufnahme gezeigt [67]. Für die enge Beziehung zwischen Kalium- und Mg-Homöostase spricht auch die Beobachtung, dass die Prävalenz einer Hypomagnesiämie bei hypokaliämischen Patienten bei 42% liegt [96]. Gegen einen kausalen Zusammenhang von Hypomagnesiämie und Hypokaliämie sprechen allerdings tierexperimentelle Untersuchungen an NCCT-defizienten Mäusen: zeigen diese doch lediglich die phänotypischen GS-Merkmale Hypomagnesiämie und Hypokalziurie, jedoch keine Hypokaliämie [79]. Ellison wiederum spekuliert über die Möglichkeit einer unphysiologischen Mg-Sekretion beim GS [25]. Eine tubuläre Mg-Sekretion wäre denkbar, wenn sich das DCT-Epithel aufgrund des NCCT-Defekts in ein elektrogen natrium-resorbierendes transformieren würde. Dies kann auf einer vermehrten Aktivierung der aldosteron-sensitiven, ENaC-abhängigen Na-Resorption beruhen [2,11]. Die ENaC-Aktivität führt zu einer Lumen negativität, die Triebkraft eines parazellulären Mg-Austritts sein könnte. Eine weitere, von nicht wenigen Autoren favorisierte Hypothese basiert darauf, dass im DCT zwei Zellpopulationen vorkommen: DCT1 und DCT2, die sequentiell aufeinander folgen [2]. DCT1-Zellen exprimieren den NCCT und TRPM6, DCT2-Zellen den amiloridsensitiven Natrium-Kanal (ENaC). Nun zeigen sowohl Patienten mit einer Langzeit-Thiazidtherapie als auch NCCT-depletierte Mäuse eine deutliche Reduktion der DCT1-Zellmasse, vermutlich als Folge einer Zelloptose [48]. Vor dem Hintergrund, dass in DCT1-Zellen der apikale Magnesium-Kanal (TRPM6) koexprimiert wird [92] und in den DCT2-Zellen der apikale Kalzium-Kanal (ECaC) [47], könnte die Apoptose der DCT1-Zellen eine plausible Erklärung für die Hypermagnesiurie beim GS sein, weil dadurch ein relativer Mangel an apikalen Magnesiumkanälen bestünde und somit eine Magnesiumresorption verhindert würde. Auch die typische Koinzidenz mit Hypokalziurie findet in diesem Modell eine Erklärung, da durch Hyperplasie der DCT2-Zellen die apikalen Kalzium-Kanäle zahlenmäßig nun deutlich dominieren würden. Jüngere Mikropunktionsstudien bei NCCT-Knockout-Mäusen oder bei thiazid-langzeitbehandelten Mäusen bestätigten die Apoptose der DCT1-Zellen nicht, fanden aber eine signifikante Reduktion (*down-Regulation*) der TRPM6-Expression [57].



Neben dem renalen Magnesium-Verlust zeichnen sich GS-Patienten durch eine Hypokalziurie aus, dies wird auch in dem Begriff der *Dissoziation des renalen Calcium- und Magnesium-Handlings* zusammengefasst [7]. Anders als im TAL findet die Kalziumresorption wahrscheinlich transzellulär statt, da die DCT-Zellen zum einen über ein für divalente Kationen undurchlässiges Schlussleistennetz verfügen, zum anderen fehlt ein elektrochemischer Gradient (transzelluläre Spannung bei 0 mV) [65]. Annahme ist, dass bei NCCT-loss of function (genetisch oder pharmakologisch) neben der Hyperplasie der Ca-Kanäle tragenden DCT2-Zellen die Ca-Resorption durch Hyperpolarisation des Epithels gesteigert wird, da in diesem Milieu apikale Kalziumkanäle aktiviert werden [14,25]. Resorbierte Kalzium-Ionen verlassen im Austausch gegen Natrium-Ionen über einen basolateralen Na/Ca-Austauscher die Zelle. Treibende Kraft ist einerseits der Natrium-Gradient über die basolaterale Zellmembran, aber auch Beteiligung einer basolateralen Kalzium-ATPase wurde postuliert [25,28,68].

Neuere Mikropunktionsstudien an thiazid-exponierten Mäusen wiesen auch auf eine kompensatorische Steigerung der Natriumresorption im proximalen Tubulus mit konsekutiv erhöhter passiver Kalziumresorption im gleichen Tubulussegment [57].

Studien bei GS-Patienten öffnen weiterhin Wege, komplementäre Informationen zur distal-tubulären Mg- und Ca-Resorption zu gewinnen, gegebenfalls auch die oben aufgezeigten Widersprüche aus den Experimenten an übrigen Säugetier-Organismen aufzulösen.

1.1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurden 28 Patienten aus 22 Familien mit dem klinischen Phänotyp GS oder cBS auf Mutationen im NCCT kodierenden *SLC12A3*-Gen untersucht. Bei allen Patienten konnten im Vorfeld der Untersuchung Chloridkanal-Mutationen im *CLCNKB*-Gen ausgeschlossen werden. In der Vergangenheit wurden Mutationen im *SLC12A3*-Gen als alleinige molekulare Ursache für das GS erkannt [16,17,46,53,85,90,98]. Diese Annahme wurde durch jüngere Beobachtungen in Frage gestellt, in denen *CLCNKB*-Mutationen mit dem typischen GS-Phänotyp assoziiert waren [36,100]. Umgekehrt sind bisher in wenigen Einzelfällen auch NCCT-Mutationen beschrieben, die nicht mit dem vollständigen klinischen Profil des Gitelman-Syndroms korrespondierten [72]. Diese Arbeit soll daher an einer Kohorte mit heterogenerer klinischer Manifestation nach Hinweisen suchen, ob *SLC12A3*-Mutationen zu einem variableren Phänotyp als bisher bekannt führen können. Die detektierten Mutationen werden durch Vergleich mit Kontrollallelen und Alignment mit orthologen Genen verschiedener Spezies hinsichtlich ihrer pathogenetischen Relevanz geprüft. Darüber hinaus wird nach Mutations-Schwerpunkten (sogenannte *hot spots*) gesucht und die Ergebnisse in den Kontext bisheriger Beobachtungen gestellt.

1.1.5.1 Zusammenfassung der Zielsetzung

- Null-Hypothese: *SLC12A3* Mutationen führen uniform zu einem GS-Phänotyp.
- Identifizierung neuer *SLC12A3* Mutationen in einem 28 Patienten-Kollektiv mit renalem Salzverlust vom Thiazid-Typ
- Akkumulation der *SLC12A3* Mutationen in einem *hot spot*?

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

In die Untersuchung eingeschlossen wurden Patienten mit klinischen und laborchemischen Merkmalen einer HSLT vom Thiazid-Typ und sofern vorliegend ihre Verwandten 1. Grades. Die Patienten wurden aus der hiesigen kindernephrologischen Ambulanz rekrutiert oder Patienten-DNA wurde von pädiatrischen Nephrologien in- und ausserhalb Deutschlands an das genetische Labor der Kinderklinik der Marburger Philipps-Universität eingesandt. Die Phänotyp-Daten wurden direkt aus den Krankenakten oder anhand eines von den peripheren Kliniken beantworteten standardisierten Fragebogens erhoben (siehe Anhang 7.2). Folgende Merkmale werden in dem Fragebogen berücksichtigt:

1. Schwangerschaftsanamnese mit Angaben zu Gestationsalter und Polyhydramnion
2. Zeitpunkt und Symptome bei Erstmanifestation, sonographischer Nachweis einer Nephrokalzinose
3. laborchemische Parameter im Serum : Kalium, Chlorid, Magnesium, Bikarbonat, Renin, Aldosteron
4. Urinchemie: Iso-/Hypothenurie, renale Kalzium- und Prostaglandin E₂-Exkretion
5. Wachstum : Wachstumsentwicklung, Körpergröße in Perzentilangabe, STH-Mangel
6. Vorgeschichte der Familie: Nationalität (bzw. ethnische Herkunft), Konsanguinität, kurzer Stammbaum mit Frage nach gesunden bzw. betroffenen Geschwistern
7. gegenwärtige Therapie

2.2 Allgemeine Materialien

2.2.1 Geräte und Hilfsmittel

Liste der allgemein verwendeten Hilfsmittel und Geräte, auf die in der folgenden Arbeit nicht mehr gesondert eingegangen wird:

- Kühltzentrifuge Biofuge fresco (Fa. Heraeus, Osterode)
- Kühltzentrifuge Varifuge 3.0 RS (Fa. Heraeus, Osterode)
- Tischzentrifuge (Fa. Qualitron, Korea)
- Power Supply – EPS 200 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Power Supply – EPS 600 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Analysenwaage Modell 510 (Fa. Kern, Albstadt)

-
- Feinwaage Modell R180D (Fa. Sartorius, Göttingen)
 - Milli-Q-Water System (Fa. Millipore, Eschborn)
 - Vortex Laborrührer VF2 (Fa. Janke&Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen)
 - Überkopfdreher Modell REAX2 (Fa. Heidolph, Kehlheim)
 - pH-Meter Delta 340 (Fa. Mettler, Halstead/England)
 - Magnetrührer MR 3001 K (Fa. Heidolph, Kehlheim)
 - Mikrowellenofen Modell R-7180 (Fa. Sharp/England)
 - Dampfsterilisator HAST 400L (Fa. Zirbus, Bad Grund)
 - Photodokumentationssystem Bioprint V.96 (Fa. Vilber Lourmat, Marne/Frankreich)
 - UV- Flächenstrahler TFX (Fa. Vilber Lourmat, Marne/Frankreich)
 - Plattformschwenker (Eigenbau der Werkstatt der Universität Marburg)
 - Pipetten und Spitzen (Fa. Eppendorf, Hamburg, und Fa. Abimed, Düsseldorf)
 - Pasteurpipetten (Fa. Brand, Wertheim)
 - Röhrchen und Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg, und Fa. Greiner, Nürnberg)
 - Spritzen (Fa. Becton Dickinson, Dublin/Irland)

2.2.2 Chemikalien und Reagenzien

Die aufgeführten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad p.A.

- Borsäure Kat.Nr. M202.11 (Fa. GATC, Konstanz)
- Bromphenolblau Na-Salz Kat.Nr. A512.1 (Fa. Roth, Karlsruhe)
- DEPC Kat.Nr. D-5758 (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Essigsäure 100% Kat.Nr. 1.00063 (Fa. Merck, Darmstadt)
- Ethidiumbromid Kat.Nr. 1.11615 (Fa. Merck, Darmstadt)
- Ficoll 400 Kat.Nr. F-4375 (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Na-EDTA Kat.Nr. 03677 (Fa. Fluka Biochemika, Neu-Ulm)
- Natriumhydroxid Kat.Nr. 0402 (Fa. Mallinckrodt Baker, Deventer/Niederlande)
- Tris Kat.Nr. 17-1321-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Xylencyanol Kat.Nr. A513.1 (Fa. Roth, Karlsruhe)
- 100 Base-pair ladder Kat.Nr. 27-4001-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- DEPC- Wasser
- 1 M Tris-HCL, pH 8,0
- 0,5 M EDTA, pH 8,0
- TE-Puffer, pH 8,0
- TAE-Puffer, pH 8,0

- TBE-Puffer
- Loading buffer

2.3 DNA-Gewinnung

2.3.1 Material

Geräte

- Spektral-Photometer GeneQuant II Kat.Nr. 80-2105-98 (Fa. Pharmacia Boitech, Uppsala/Schweden)
- Quarzglasküvette Kat.Nr. 105.202.008-QS (Fa.Hellma, Mülheim)

Chemikalien

- Nukleon® BACC2 Extraction Kit Kat.Nr. SL-8502 (Fa. Scotlab Bioscience, Coatbridge/Schottland)
 Inhalt: 1) Lösung A: 10 mM Tris-HCL
 320 mM Sucrose
 5 mM MgCl₂
 1% Trinton X-100
 pH 8,0 mit 40% NaOH (autoklaviert)
 2) Lösung B: 400 mM Tris-HCL
 60 mM EDTA
 150 mM NaCl
 pH 8,0 mit 40% NaOH (autoklaviert)
 1% SDS
 5 M Natrium-Perchlorat
 Nucleon® RESIN Silica-Lösung
- Ethanol absolut Kat.Nr.32205 (Fa.Riedel-de Haen, Seelze)
- Chloroform Kat.Nr.1.02445 (Fa.Merck, Darmstadt)

2.3.2 Methode der DNA- Isolierung aus Vollblut

Für die DNA- Isolierung werden 5-10 ml EDTA-Blut benötigt. Dieses sollte möglichst rasch verarbeitet oder bei -80°C zwischengelagert werden, um Zelllysen und Degradationsprozesse durch DNAasen möglichst gering zu halten. Das Blut wird in ein 50 ml-Röhrchen überführt und mit 4 Volumenanteilen von Lösung A (Nucleon BACC2 Extraction Kit) versetzt. Anschließend wird das Gemisch für 4 Minuten im Überkopfdreher geschüttelt und für 4 weitere Minuten bei 1300 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert und das Pellet in 2 ml Lösung B resuspendiert. Zur Entproteinisierung wird die Zellsuspension in ein 5 ml-Röhrchen überführt, mit 500µl Natrium-Perchlorat versetzt und einige Male vorsichtig manuell geschüttelt. Im nächsten Schritt der DNA- Extraktion werden 2 ml Cholorform hinzupipettiert, wiederum einige Minuten vorsichtig geschüttelt, 300 µl Nucleon® Resin Silica- Lösung hinzufügt und für mindestens 3 Minuten bei 1300 g und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wird in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt, das Proteinpellet wird verworfen. Zum Überstand wird im Verhältnis 1:2 gekühltes Ethanol absolut gegeben. Durch behutsames Schütteln der Röhrchen präzipitiert die DNA dann als ein feines Netzwerk. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wird die isolierte DNA aufgenommen und zweimal in gekühltem 70%-Ethanol gewaschen. In einem offenen Eppendorf-Röhrchen wird sie nun über Nacht bei Raumtemperatur und anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die trockene DNA wird entsprechend der Ausbeute in TE-Puffer (100-500 µl) resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt.

Nach vollständiger Resuspension der DNA wird deren Konzentration mit Hilfe eines Spektralphotometers gemessen. Da die heterozyklischen, stickstoffhaltigen Basen der DNA ein Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweisen, kann deren Konzentration durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt werden. Hierbei entspricht eine Extinktion von 1,0 oder 1 OD (optische Dichte Einheit) einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Um die Probe auf mögliche Verunreinigung durch Proteine zu untersuchen, wird zusätzlich beim Absorptionsmaximum für Proteine bei 280 nm gemessen. Der Quotient $E^{260}/_{280}$ ergibt ein Maß für die Reinheit der Probe. Das Verhältnis sollte bei einer reinen DNA-Präparation zwischen 1,5 und 2,0 liegen. Die Genauigkeit der Messwerte kann durch Mehrfachbestimmungen erhöht werden. Zum Herstellen der Arbeitslösung wird ein Aliquot der Stammlösung mit DEPC-H₂O auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt.

2.4 Gelelektrophorese

In der vorliegenden Arbeit werden ausschließlich Gelelektrophoresen in Agarose oder Polyacrylamid durchgeführt, da sich die Gele durch ihren „Molekularsieb-Effekt“ hervorragend zur Trennung von Nukleinsäure-Molekülen eignen. Hauptladungsträger der Nukleinsäuren sind die negativen Phosphatgruppen, die für jeden Nukleotidbaustein die gleichen pK-Werte besitzen; dementsprechend sind pH-Wert-Unterschiede nicht sehr effizient zur Auftrennung von verschiedenen Nukleinsäure-Molekülen. Zum anderen zeigt sich, dass die Auftrennung nicht von Ladungsungleichheiten abhängt. Demzufolge ist die Molekülgröße ausschlaggebend für die Wanderungsgeschwindigkeit und somit für die Wanderungsstrecke im Gel.

Vergleicht man lineare doppelsträngige DNA-Moleküle, so zeigt sich eine Trennung proportional zum Molekulargewicht, da ein konstanter Ladungs-Masse-Quotient vorliegt. Denaturierte oder anders konformierte DNA zeigt erhebliche Unterschiede im Laufverhalten. Dies macht man sich in der SSCP-Analyse zunutze (siehe Abschnitt 2.6). In Agarose-Gelen

mit einer Konzentration von 0,5% (w/v) lassen sich DNA-Fragmente im Bereich von 1000-15000 bp (Basenpaare) gut auftrennen. Gele mit höherer Agarose-Konzentration sind geeignet zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 100-2000 bp (Abb.2-1). Hochkonzentrierte Polyacrylamid-Gele dagegen sind in der Lage, einzelne Nukleotide zu trennen, was sie für Mutationsanalyse zu einer wertvollen Methode macht, insbesondere für die Sequenzierung.

In ihrer Grundform besteht die Elektrophorese aus einer Elektrophoreseeinheit und einer Spannungsversorgung (Gleichstrom). Die Elektrophoreseeinheit ist ein Puffertank, in den das Gel vollständig eintaucht. Davon weicht die Polyacrylamid-Gelelektrophorese ab, bei der lediglich die beiden Enden in die Pufferlösung

eintauchen. Zwischen Start- und Stopseite wird nun eine Gleichspannung angelegt, so dass die negativ geladenen DNA-Moleküle in Richtung Anode wandern.

Die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld hängt unter anderem von den gewählten Laufbedingungen ab. So beeinflussen die Stromstärke, die Pufferbedingungen und vor allem die Konzentration des Trägermediums die Wanderung im Gel.

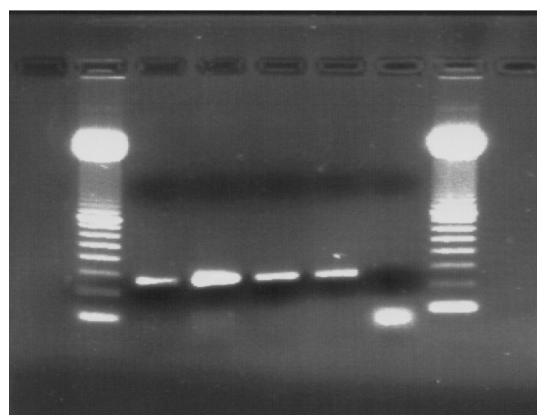


Abbildung 2-1 Agarose-Gel 1,5%(w/v): jeweils rechts und links der Standard (100 bp-ladder), dazwischen PCR-Produkte 1-4 (Größe der Fragmente ca. 200-300 bp) und an Position 5 die Leerwertkontrolle, hier bildet sich nur das Primerpaar ab.

2.5 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

2.5.1 Beschreibung

Die Polymerase-Chain-Reaction ist eine 1984 durch Kary Mullis entwickelte enzymatische In-vitro-Amplifizierung von spezifischen Nukleinsäurefragmenten, ohne dass man lebende Zellen wie Bakterien verwenden muss. Der Name Polymerase-Kettenreaktion rührt daher, dass bakterielle Polymerasen zur DNA-Vermehrung zum Einsatz kommen. Mittels der PCR können bis zu 10^5 - 10^6 Kopien eines spezifischen DNA-Abschnitts hergestellt werden, die dann in vielfältiger Weise für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen- wie beispielsweise in dieser Arbeit für die Mutationsanalyse. Voraussetzung für den Einsatz der

PCR-Technik ist die Kenntnis der zu amplifizierenden Sequenz bzw. deren 5'-Enden, da die DNA-Polymerase eines 10-15 Nukleotide langen komplementären DNA-Stückes zur Initiierung der Synthese bedarf. Diese Oligonukleotide werden auch Primer genannt und flankieren den zu untersuchenden DNA-Bereich [56].

Der Reaktionszyklus beginnt mit der Denaturierung der Doppelstrang-DNA in ihre Einzelstränge durch deren Erhitzen auf über 90°C. Während der Abkühlungsphase können die Oligonukleotid-Primerpaare komplementär zu den jeweiligen 5'-Enden der Einzelstränge binden. Diesen Prozess nennt man Annealing; er verlangt für jedes Primerpaar ein spezifisches Temperaturoptimum. Anschließend folgt die DNA-Synthese (Elongation) durch Erhöhung der Temperatur auf 72°C. Durch zyklische Wiederholung der Abläufe Denaturierung, Annealing und Elongation wird bei 25-35 Zyklen eine ausreichende DNA-Menge amplifiziert (siehe Abb.2.2). Anfangs mussten bei Anwendung der Methode aufgrund der Proteolyse durch die hohen Denaturierungstemperaturen jeweils neue bakterielle Polymerase hinzugefügt werden, wodurch die Methode aufwändig und teuer war [56]. Dieses Problem wurde mit der Entdeckung der Taq-Polymerase gelöst. Hierbei handelt es sich um eine thermostabile Polymerase von Bakterien der Spezies *Thermus aquaticus*, die in heißen Quellen leben und bei der Denaturierung Temperaturen von 90-95°C standhalten.

Die PCR eignet sich für die Amplifizierung von Fragmenten der Länge 10^2 - 10^4 bp und wird heutzutage durch automatisierte Thermostaten (Thermocycler) durchgeführt, so dass für 30 Reaktionszyklen ungefähr 1,5 h benötigt werden.

Die häufigste Fehlerquelle der PCR ist die Kontamination durch nicht in den PCR-Ansatz gehörende DNA. Diese kann z.B. aus Hautschuppen oder im Speichel enthaltenen Zellen des Experimentators stammen. Aus diesem Grund sind bei jeder PCR Negativkontrollen eine unabdingbare Voraussetzung.

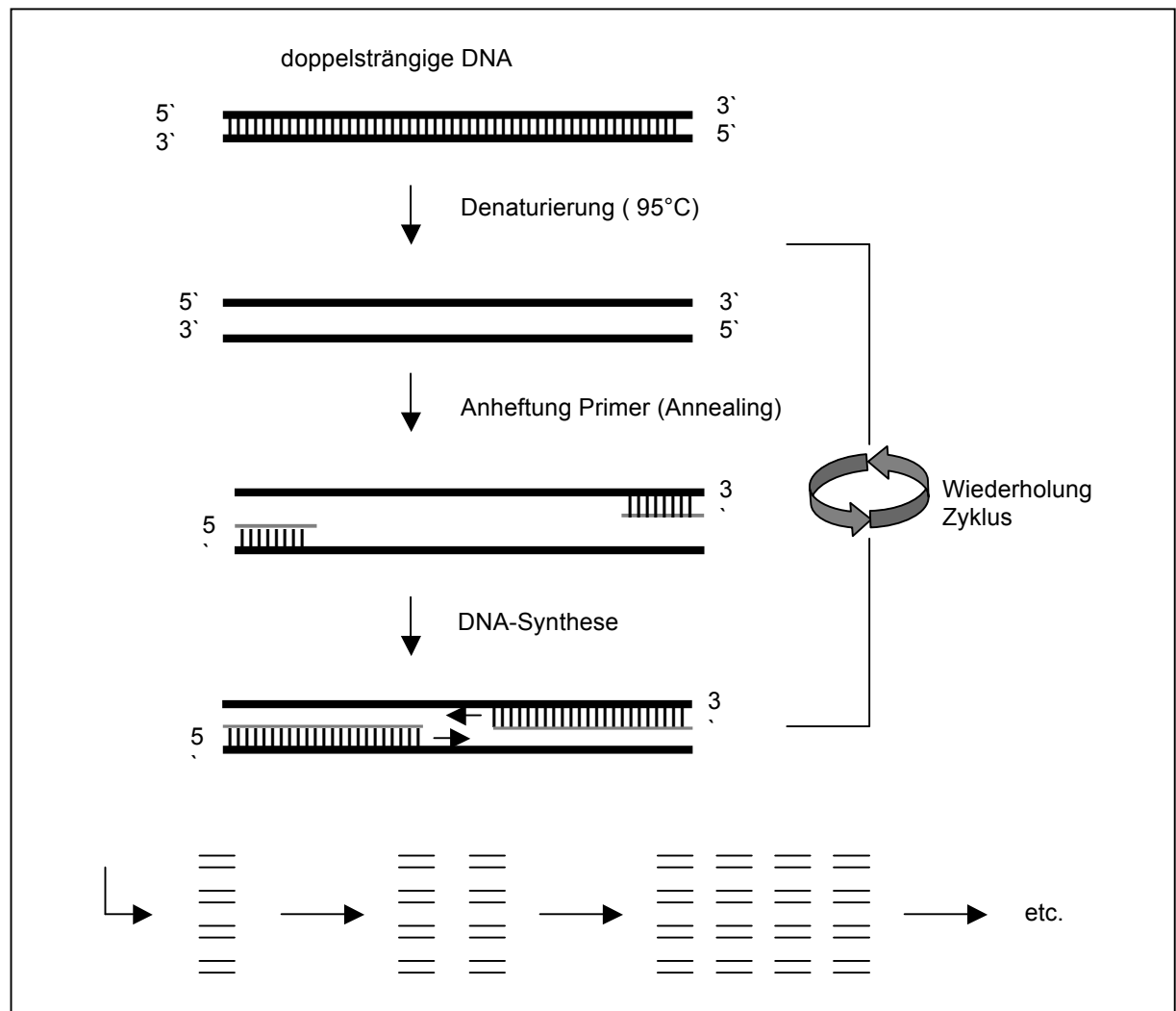


Abbildung 2-2: schematische Darstellung des PCR-Prinzips

2.5.2 Chemikalien

- Taq DNA Polymerase Kat.Nr. 27-0799 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- 10x Reaction Buffer Kat.Nr. 27-0799A (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
(500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0)
- Polymerization Mix (20 mM dNTP) Kat.Nr. 27-2094-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Oligonukleotid-Primer (Fa. Life Technologies, Eggenstein)
- DEPC-H₂O
- Qualex-Gold-Agarose (Fa. AGS GmbH, Heidelberg)
- 100 base-pair Ladder
- Ethidiumbromid
- TAE-Puffer 1x

2.5.3 Durchführung

Die zur PCR benötigten Oligonukleotid-Primer werden im Vorfeld nach Vorlage der Sequenz aus einer Publikation kommerziell synthetisiert [85] (siehe Tabelle 1). Der Forward-Primer besteht aus einer antegraden Basensequenz des Forward-Stranges im 5'-Bereich des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts, der Reverse-Primer aus einer retrograden des Reverse-Stranges im 3'-Bereich. Ein PCR-Ansatz enthält grundsätzlich die zu amplifizierende DNA, Forward- und Reverse-Primer, Reaktionspuffer, die zur Synthese benötigten Desoxynukleotide und Taq-Polymerase. Ein Reaktionsansatz enthält 20 µl Gesamtvolumen und teilt sich wie folgt auf:

- 0,5 µM Forward- und Reverse-Primer
- 100 µM dNTP
- 50 mM KCl
- 1,5 mM MgCl₂
- 10 mM Tris-HCl pH 9,0
- 50 ng DNA
- 1 U Taq-Polymerase

Die in Abschnitt 2.5.1 beschriebenen Reaktionsschritte der PCR werden von automatisierten Thermocyclern durchgeführt und beginnen mit einer 5-minütigen Denaturierungsphase bei 94°C. Anschließend folgt die dreiteilige Zyklusphase, welche je Teilphase 30 Sekunden in Anspruch nimmt. Im ersten Schritt wird erneut bei 94°C denaturiert, danach kühlt der Ansatz auf die spezifische Annealing-Temperatur der Oligonukleotid-Primer ab. Die Annealing-Temperatur wird im Vorfeld experimentell ermittelt und bewegt sich meist um eine Temperatur von 65°C. In der letzten Zyklusphasen erfolgt die Elongation durch die von der Taq-Polymerase katalysierte DNA-Synthese bei 72°C. Dieser Zyklus wird je nach DNA-Ausbeute 30-35 mal wiederholt. Die ganze Reaktion endet mit einem letzten Kettenverlängerungsschritt bei 72°C für 5 Minuten. Die PCR-Produkte werden bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C bis -20°C gelagert.

Die abschließende Agarose-Gelelektrophorese dient der Überprüfung, ob genügend DNA mittels PCR angereichert wurde. Die Auswertung erfolgt rein qualitativ bis semi-qualitativ. Bei einer zu erwartenden Fragmentlänge der PCR-Produkte zwischen 150-250 bp wurden in der Regel 1,5% (w/v) Agarose-Gele verwandt. Als Laufpuffer dient TAE-Puffer, der das Gel vollständig umgibt. Man beschickt die Geltaschen mit 15 µl eines

Gemisches aus 8 μ l PCR-Produkt, 4 μ l Milli-Q-H₂O und 3 μ l blaufarbenen Probenpuffers. Durch Mitführen eines Standards (100 Base-pair Ladder) in einer dem PCR-Produkt gleichen Menge kann später die Fragmentgröße abgeschätzt werden. Die blaue Farbe des Probenpuffers (Bromphenolblau) dient im Agarose-Gel als Orientierung für die zurückgelegte Wanderstrecke. Der Puffer bildet aufgrund des niedrigeren Molekulargewichts die Front des Auftrennungsprozesses. Des Weiteren wird eine Negativkontrolle mitgeführt; in dieser wird DNA durch DEPC-H₂O ersetzt. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel für 15 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt (10 μ l Ethidiumbromid auf 100 ml Milli-Q-H₂O) und anschließend unter fließendem Wasser gespült. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der sich zwischen die Basenpaarungen der DNA einlagert bzw. interkaliert und hier intensiv orange fluoresziert. Diese fluoreszierenden Banden werden mit Hilfe eines UV-Flächenstrahlers sichtbar gemacht und das Ergebnis dokumentiert (siehe Abbildung 2-1).

Tabelle 1 Oligonukleotidprimer SLC12A3-Gen nach Simon et al. [85]

Exon	Forward-Primer	Reverse-Primer
1A	TCCTGGCCCCTCCCTGGACAC	ATAGAGCTCATATGTGGGCAC
1B	CAGCACCTTCTGCATGCGCAC	GGAAGTGGCCAGTCTTCTGAG
2	CTACTGCCTGACTTGTGGTC	TCGACATCACGCACCACCCAC
3	TGTCCACCCAGGTGGCCTCTG	GCTGGGAAGAATGGGATTCTAG
4	GCCCTGCCTAAGCTTTGGGTG	CTCGAGAGGAGGGCCTTGGTG
5	TGGTTTCATGGTTCCCGGCTC	ATCCCTCTACCCAGGGTCCAG
6	CAGAGGGTGGCTTGCAGCCTG	GCTTCTCCACGTGACCACCTC
7	TACTGACCTCTGAGGTCCCTC	AGAGCCATGGTCAGGGCCTTG
8	AGTCTTACTCATCAGGCCTTG	CGGCAGATGCCACTAGAGCAG
9	CTCTCTCCCTCCCTCCTTCAG	CTGCAGGGTGGAGGCCAGGTC
10	AGGACAGAGTAAGGAGGGAAG	GTGTCTGGTGGGTCAGCTCTC
11	CAGTAGGGAATGAAGTGCCAC	TTGTGCCTCTAGCCCAGGCTC
12	AGTGGCAGGTCCCAGCCTAAG	AACAGGAGGCCAGGCCCTGTG
13	AGACTGTCCTCTCTCTCCCTG	TGCCTCCTCCTGAGGTGGGTG
14	AGGCATGCCCACTGACTGGTG	GCCGCCTGCATGGCTACCCTG
15	CGTGTCTGGTTTCCTCTAGTG	GCCGCCTGCATGGCTACCCTG
16	AGGTGCCTTTCGCACCCAGAC	TGCTGGGTTTACAGGCATGAG
17	GACATCACCAGCTGCCTTCAC	GCCACCAAGCCGTAAGTCCTG
18	GTTCCCCATCTCACCCCTATC	CACTTGCTCAAGGCCCAATGG
19	GGAGAAGCTGGACCTCACCTC	AGAACTTTCTGGGAGTGGGTG
20	ACGGTGCCCTCAGACAAGGAG	GAGTGCCCTGAGCTCTGAGTG
21	GGCTGCTGGCTCTGCTCTGAC	GGGCAGGAGGGCTGATCCAAG
22	CATAGTGCTCTGTCCTGAGTG	AGATGACACTGGTCCCTGCAG
23	GACAGAGCAAGACGCTGTCTC	CACAGTTGGCCCTTCTGCCTG
24	TCTCAGCCGGCCTCAACCCAC	TCCCTGACCCAGTGATGTGTC
25	GGTGAAGGATTGAGTGACCTC	CACCTGACTCTGGACAGACTG
26	ACTTTGCCCATAGGGAGGAAG	AGAGCTGTGGACAGGGATGTC

2.6 SSCP (single-strand conformation polymorphism)

2.6.1 Beschreibung

Die SSCP-Methode ist ein sensitives Verfahren zur Detektion von Unterschieden in der DNA- Basenabfolge, beispielsweise als Folge einer Punktmutation [61,62]. Es handelt sich um eine modifizierte Gelelektrophorese; Abweichungen im Laufverhalten bzw. der Bandenmuster der DNA-Fragmente weisen auf eine Veränderung der Basensequenz hin, ohne jedoch eine Aussage über Art und Lokalisation der Veränderung zuzulassen. Dies kann letztlich nur die Sequenzierung leisten. Da ein großer Probenumsatz möglich ist und hinreichende Sensitivität besteht, eignet sich die SSCP-Methode in besonderer Weise zum Mutations-Screening [19,22,51]. Die SSCP-Methode basiert auf dem Prinzip, dass die durch Hitzedenaturierung und Formamid einzelsträngig gemachte DNA eine gefaltete Struktur aufweist, die durch intramolekulare Interaktionen determiniert ist. Diese sogenannte Sekundärstruktur der DNA (englisch: *conformers*) zeigt ein spezifisches Wanderungsmuster in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel. Ein DNA-Molekül mit einer Mutation, sei sie nur ein Nukleotid-Austausch, zeigt gegenüber dem Wildtyp ein abweichendes Laufverhalten während der Elektrophorese (siehe Abb.2-4). Zur Gel-Auswertung wird die DNA nach Abschluss der elektrophoretischen Auftrennung durch Silberfärbung als Bande visualisiert (Abb.2-3). Die Sensitivität der SSCP-Technik wird kontrovers beurteilt, die Einschätzungen variieren zwischen 35 [76] und beinahe 100% [61]. Neben Temperatur, Gel-Additiva, Acrylamidkonzentration etc. hat die DNA-Fragmentlänge den größten Einfluss auf die Sensitivität. Die Sensitivität verliert sich mit zunehmender Fragmentgröße. Eine Fragmentlänge von 200 bp und kleiner wird als optimal angesehen.

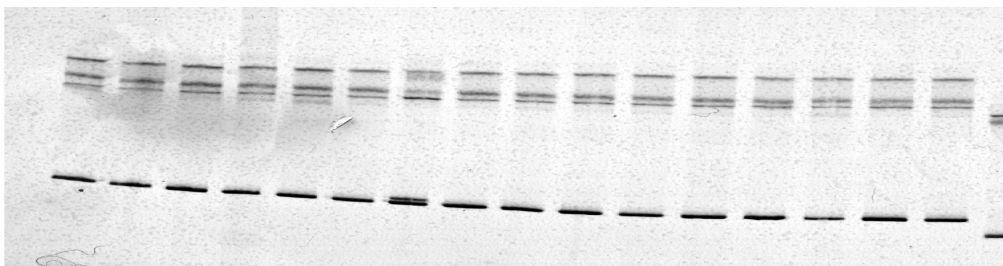


Abbildung 2-3: SSCP-Gel-Beispiel

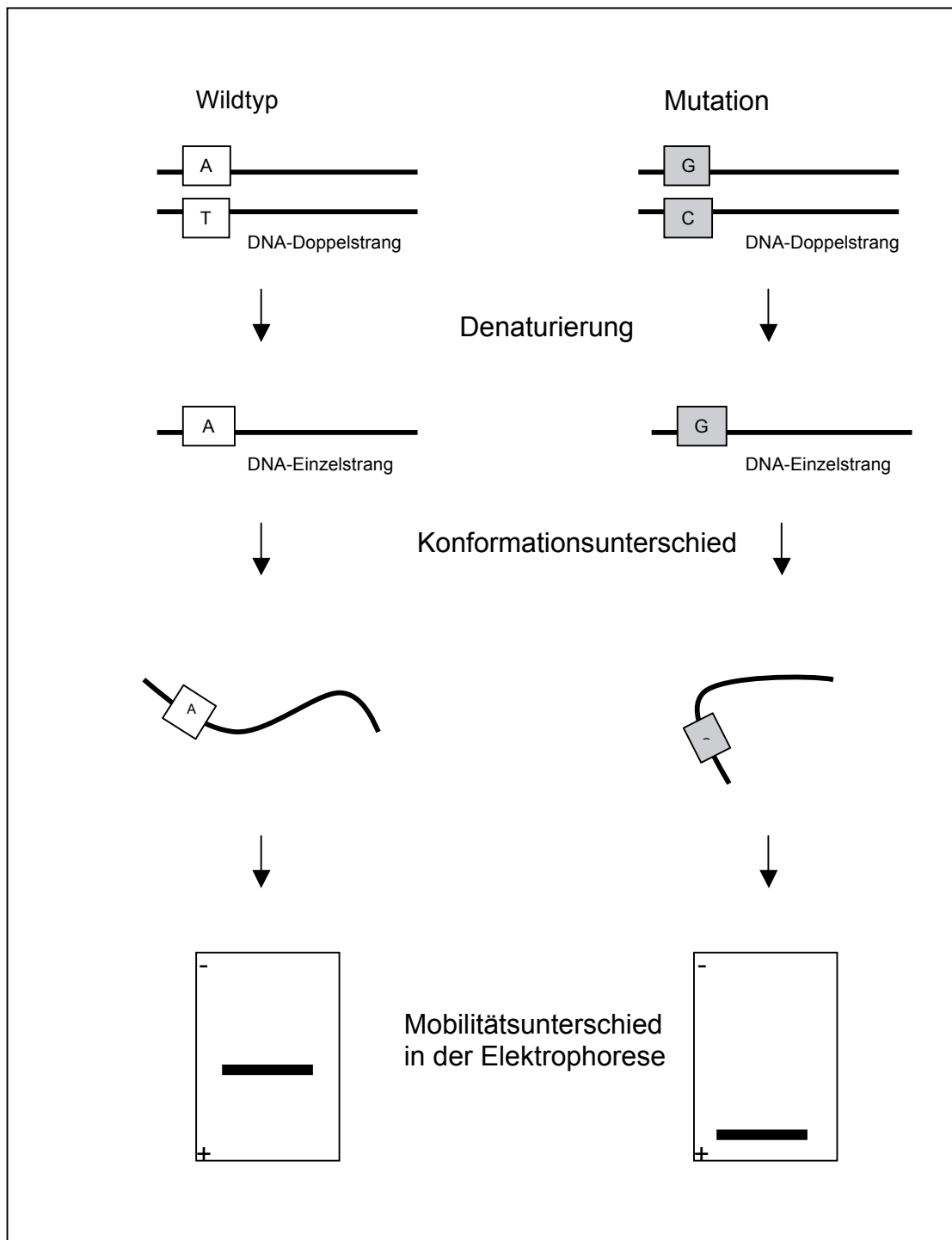


Abbildung 2-4: schematische Darstellung des SSCP-Prinzips

2.6.2 Material

2.6.3 Geräte

- Thermomixer Modell 5436 (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Kühlgenerator Multi Temp® III Kat.Nr. 18-1102-78 (Fa. Pharmacia-Biotech, Uppsala/Schweden)
- ElektrophoresisUnit Multiphor® II Kat.Nr. 18-1018-06 (Fa. Pharmacia-Biotech, Uppsala/Schweden)
- GelPool Kat.Nr. 18-1031-58 (Fa. Pharmacia-Biotech, Uppsala/Schweden)
- PaperPool Kat.Nr. 18-1031-59 (Fa. Pharmacia-Biotech, Uppsala/Schweden)

2.6.4 Chemikalien

- CleanGel DNA Analysis Kit Kat.Nr. 17-1198-06 (Fa. Pharmacia-Biotech, Uppsala/Schweden)
beinhaltet:

CleanGel 48S	Sammelgel (5%)
	Trenngel (10%)
Gelpuffer	Puffer pH 8,45
	0,001% Bromphenolblau
	0,001% Orange G
Elektrodenpuffer	Puffer pH 7,9
Papierelektrodenstreifen	
- Formamid Kat.Nr. 1.09684 (Fa. Merck, Darmstadt)
- PlusOne™ DNA Silver Staining Kit Kat.Nr. 17-6000-30 (Fa. Pharmacia-Biotech, Uppsala/Schweden)
beinhaltet:

Fixierlösung 5x	Benzschwefelsäure	3,0% w/v in 24% Ethanol
Silbernitratlösung 5x	Silbernitrat	1,0% w/v
	Benzschwefelsäure	0,35% w/v in H ₂ O
Entwicklerlösung 5x	Natriumkarbonat	12,5% w/v in H ₂ O
Stop-Lösung 5x	Essigsäure	5% v/v
	Natriumazetat	25% w/v
	Glyzerol	50% w/v in H ₂ O
Formaldehyd 37% w/v in H ₂ O		
Natriumthiosulfat 2% w/v in H ₂ O		

2.6.5 Durchführung

Zunächst werden die DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert. In je ein Eppendorf-Röhrchen werden zu gleichen Teilen (je 3,5 µl) PCR-Produkt und Formamid vermischt und kräftig geschüttelt. Das trockene Polyacrylamid-Gel wird in der Zwischenzeit mit 25 ml Gelpuffer über eine Stunde im Gelpool rehydriert, bis es eine bläulich-violette Farbe angenommen hat. Nach Abstreifen überschüssiger Pufferlösung wird das rehydrierte Gel auf die Kühlplatte der Elektrophorese-Einheit verbracht. Zur Vermeidung von Lufteinschlüssen sollte die Unterlage mit 70% Ethanol benetzt sein. An den Gelen den werden die Papierelektrodenstreifen angebracht, nachdem sie in je 20 ml Elektrophoresepuffer getränkt wurden. Die Streifen sollten das Gel-Ende nicht mehr als 5 mm überlappen. Es folgt die Hitzedenaturierung der Proben bei 95°C für 5 Minuten im Heizblock. Anschließend werden sie sofort auf Eis gekühlt, um die Renaturierung der Doppelstrang-DNA zu verhindern. Die Geltaschen werden mit jeweils 6 µl der so präparierten Proben befüllt. Zur besseren

Unterscheidung der Proben vom Wildtyp werden Kontrollen von gesunden Probanden mitgeführt. Nach dem Probenauftrag werden Elektroden auf die Papierelektrodenstreifen angebracht und an eine Spannungsquelle angeschlossen. Zur Optimierung der Trennschärfe und damit der Sensitivität des SSCP Verfahrens findet die Elektrophorese bei dieser Untersuchung unter 2 Temperaturbedingungen statt. Bei Lauftemperatur von 15°C lässt man die Proben zunächst über 10 Minuten bei 200 V, 23 mA und 5 W durch das Trenngel wandern und steigert die elektrische Feldstärke im Anschluss für 60 Min. (Einstellung der Variablen auf 600 V, 30 mA und 18 W). Bei einer Temperatur von 4°C wird die Elektrophorese für 4 Stunden bei 200 V, 23 mA und 5 W durchgeführt. Bei höherer Spannung würde die durch Wärmeentwicklung entstehende Kondenswasserbildung auf der Geloberfläche Laufqualität und Trennschärfe beeinträchtigen.

2.6.6 Auswertung

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die DNA-Fragmente mit der Silbernitratlösung angefärbt. Die Silbernitratfärbung zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und eine gute Reproduzierbarkeit aus; dabei kann auf radioaktive Substanzen verzichtet werden. Das Gel wird in einem Metallbecken mit 100 ml Fixierlösung einmal für mindestens 30 Minuten inkubiert. Zur gleichmäßigen Färbung werden alle Färbvorgänge auf einer Plattform automatisch geschwenkt. Anschließend erfolgt die Silberimprägnierung, indem die Fixierlösung durch 100 ml Silbernitratlösung ersetzt wird. Nach weiteren 30 Minuten dekantiert man die Silbernitratlösung und wäscht das Gel für 1 Minute unter deionisiertem Wasser. Nun setzt man die Entwicklerlösung an, die sehr instabil ist und deshalb erst kurz vor Gebrauch hergestellt werden sollte. Zu 20 ml Entwicklerlösung werden 100 µl Formaldehyd und 100 µl Natriumthiosulfat pipettiert und auf 100 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Nachdem die fertige Lösung auf das Gel gegeben ist, werden innerhalb weniger Minuten Banden im Gel sichtbar. Der Vorgang sollte bei ausreichender Darstellung der Banden beendet werden, da bei zu langer Entwicklung eine Diskriminierung des feinen Bandenmusters erschwert würde. Die Entwicklerlösung wird verworfen und 100 ml Stop-Lösung hinzugefügt, die für 30 min auf das Polyacrylamidgel einwirken soll. Zum Abschluss verwirft man die Stop-Lösung, wäscht das Gel kurz unter deionisiertem Wasser und lässt es anschließend an der Luft trocknen.

Abweichungen im Bandenmuster (sogenannte *shifts*), werden am sichersten erkannt, indem man Patientenproben mit Wildtypkontrollen vergleicht. Entdeckt man ein aberrantes Bandenmuster, so muss unterschieden werden, ob es sich um einen Polymorphismus oder um

eine Mutation handelt. Jedes abweichende Bandenmuster wurde auf die Häufigkeit in der Normalpopulation geprüft, indem es mit den entsprechenden DNA-Fragmenten von 50 gesunden Probanden (entsprechend 100 Kontrollallelen) verglichen wurde. Entdeckt man den gleichen *shift* auch unter Kontrollchromosomen, spricht dies für einen Polymorphismus. Ein Polymorphismus ist eine Genvariante in der Population, welche definitionsgemäß mit einer Allel-Frequenz von über 1% vorkommt [49]. Fehlt das aberrante Bandenmuster unter Kontrollen, spricht dies für eine krankheitsrelevante Mutation. Unabhängig von der Prävalenz unter Kontrollen wurden sämtliche auffälligen Bandenmuster sequenziert.

2.7 DNA-Sequenzierung

2.7.1 Beschreibung

Es gibt im Wesentlichen zwei Methoden zur DNA-Sequenzierung, das heißt zur Bestimmung der Basenabfolge auf Molekülebene: zum einen die Methode nach Maxam und Gilbert, die auf dem Prinzip des basenspezifischen chemischen Abbaus von radioaktiv markierter DNA beruht [54], zum anderen die Methode nach Sanger, welche die heutzutage am häufigsten genutzte Sequenziertechnik ist und der vorliegenden Arbeit zugrunde liegt [75]. Die Sanger-Methode basiert auf dem Prinzip der Synthese von DNA-Strängen, welche komplementär die interessierende Matrizen-DNA abbilden, deren Synthese allerdings durch Einbau modifizierter Nukleotide an unterschiedlicher Position und zufällig terminiert wird (sogenannte Kettenabbruchmethode).

Ausgangspunkt jeder Sequenzierung ist das Vorliegen eines amplifizierten DNA-Fragments (Matrize). In einer Sequenzreaktion werden von einem definierten Initiationspunkt aus, katalysiert durch die DNA-Polymerase, komplementäre DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge synthetisiert. Die Fragmentlänge der neu synthetisierten DNA wird durch den Einbau eines modifizierten Nukleosidtriphosphats nach dem Zufallsprinzip determiniert. Die hierbei verwendeten Nukleosidtriphosphate besitzen am 3'-Kohlenstoff des Zuckers ein Wasserstoffatom an Stelle der üblichen OH-Gruppe (sogenannte 2,3-Didesoxynukleosidtriphosphate oder ddNTPs) und machen somit eine Kettenverlängerung unmöglich, da zur DNA-Elongation jene 3'-OH-Gruppe für eine die DNA verlängernde Phosphodiesterbildung benötigt wird. Für jede Sequenzierung existieren vier Reaktionsgemische, entsprechend den vier möglichen Basen der DNA, die jeweils alle Desoxynukleotide (dNTPs) und ein spezifisches Didesoxynukleotid (also entweder ddATP

oder ddCTP oder ddGTP oder ddTTP) enthalten. Das Verhältnis von nativen dNTPs und trunkierenden ddNTPs wird so gewählt, dass im statistischen Mittel in jedem Reaktionsgemisch die Polymerisation an den jeweils entsprechenden Nukleotidpositionen durch das trunkierende Nukleotid beendet werden kann. So enthält jeder der vier Ansätze mit dem Ende der Sequenzierreaktion eine Anzahl DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die alle mit für den Ansatz spezifischen ddNTP enden. Die Zahl der Fragmentlängenunterschiede in einem Ansatz ist proportional zur Häufigkeit des betreffenden Nukleotids in der analysierten DNA-Sequenz. Die Länge der jeweiligen Fragmente spiegelt auch die Position der jeweiligen Base im Matrizenstrang wieder. Alle vier Ansätze ergeben dann eine ineinandergeschachtelte Fragmentlängenreihe, welche längenspezifisch durch eine denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt wird (siehe Abb. 2-5). In der klassischen Form trägt man die Ansätze nebeneinander auf das Gel auf und färbt im Anschluss an die Elektrophorese die aufgetrennten Banden (z.B. mit $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dNTP}$ oder $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$) und liest entgegen der Laufrichtung die Basensequenz ab. Für diese Arbeit wurden automatische Sequenzierapparate genutzt, bei denen die Banden nicht nachträglich gefärbt werden müssen. Vielmehr wird die DNA während einer Sequenzierreaktion fluoreszenzmarkiert und bei der elektrophoretischen Wanderung durch einen fixen Laser detektiert (Näheres im Abschnitt Durchführung 2.7.3 und Auswertung 2.7.4).

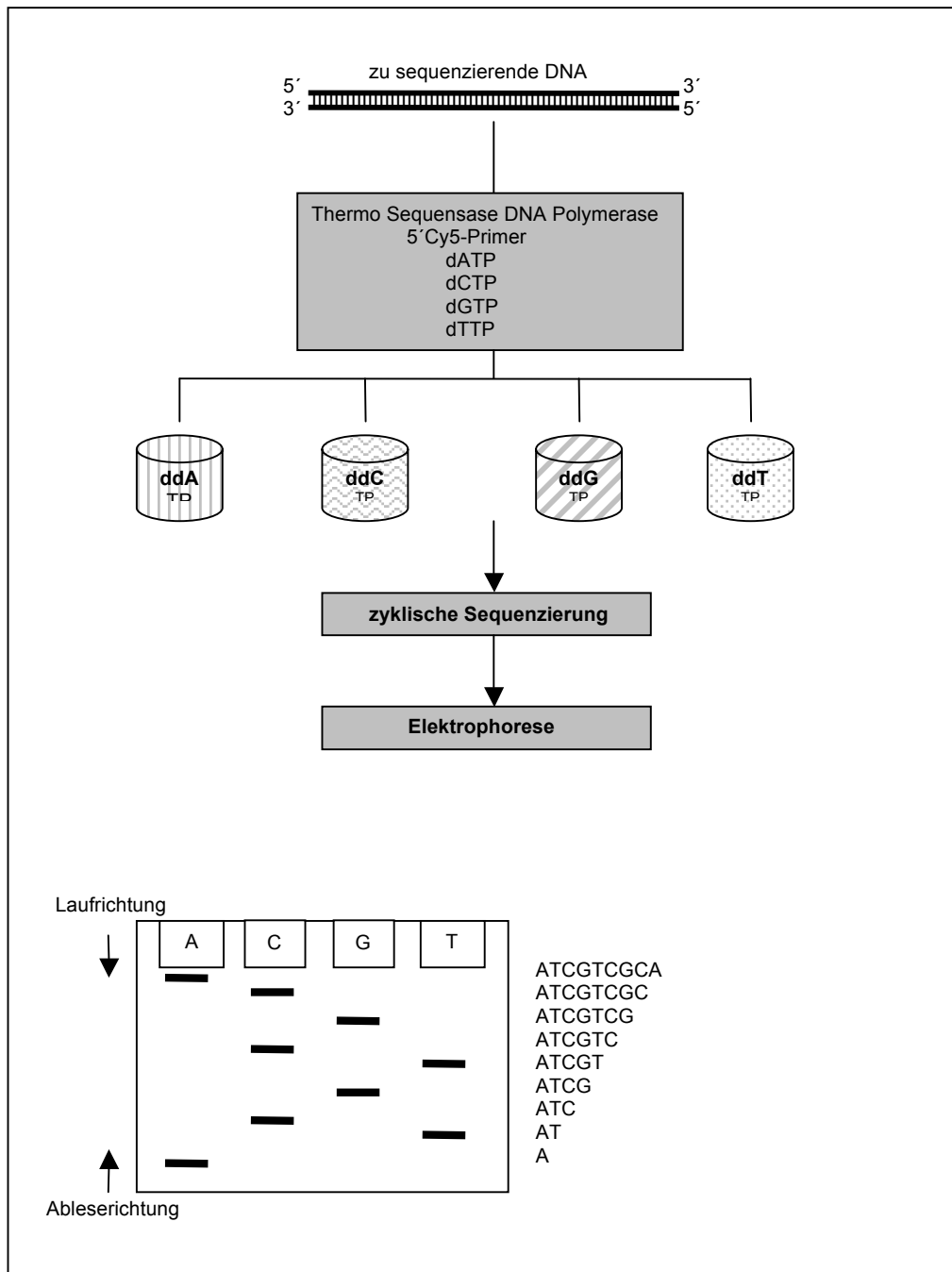


Abbildung 2-5: Prinzip der DNA-Sequenzierung mit der Kettenabbruch-Methode

2.7.2 Chemikalien

- Ammoniumpersulfat Kat.Nr. A-3678 (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- SequaGel-6™ Kat.Nr. 900610 (Fa. Biozym, Hess. Oldendorf)
 - 6% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid 19:1
 - 0,1 M Tris-Borat
 - 2mM EDTA, pH 8,3
 - 8,3 M Harnstoff
 - TEMED
- Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP Kat.Nr. RPN 2538 (Amersham Life Science, Braunschweig)

Beinhaltet:

Reagenz A	ddATP, Tris-HCl pH 9,5, Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Mercaptoethanol, dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-
-----------	---

	dGTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase
Reagenz C	ddCTP, Tris-HCl pH 9,5, Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Mercaptoethanol, dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase
Reagenz G	ddGTP, Tris-HCl pH 9,5, Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Mercaptoethanol, dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase
Reagenz T	ddTTP, Tris-HCl pH 9,5, Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Mercaptoethanol, dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase
Formamid loading dye Formamid, EDTA, Methylviolett	
<ul style="list-style-type: none"> • Oligonukleotid-Primer (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden) • DEPC-H₂O • TBE-Puffer 0,6x 	

2.7.3 Durchführung

Sequenziert wurde jedes DNA-Fragment, welche in der SSCP-Analyse ein aberrantes Bandenmuster aufwies. Für die vorliegende Arbeit haben wir ein automatisches Sequenziersystem benutzt, das die Proben nach einer zyklischen Sequenzreaktion analysiert. Im Wesentlichen besteht eine solche Sequenzierung aus drei Schritten: der Amplifizierung des zu untersuchenden DNA-Abschnitts mittels PCR, der Durchführung der Sequenz-Reaktion (sogenanntes *cycle-sequencing*) und der elektrophoretischen Auftrennung der Fragmentreihen.

Zunächst gilt es eine ausreichende Menge an DNA mittels PCR zu amplifizieren. Hierbei kommen zur späteren Fluoreszenzmarkierung der DNA modifizierte Primer zum Einsatz. Die bereits zuvor genutzten Primer sind lediglich um 20 spezifische Nukleotide im 5'-Bereich verlängert (Tabelle 2-1). Dieser verlängerte Bereich wird in der darauffolgenden Sequenzierungsreaktion als Bindungsstelle des farbmarkierten universellen Sequenz-Primers benötigt (Abb. 2-6). Die Hybridisierungsabschnitte der PCR-Primer sind so gewählt, dass sie nicht mit der PCR interferieren. Primermodifikationen sind in Tabelle 2-1 und 2-2 dargestellt.

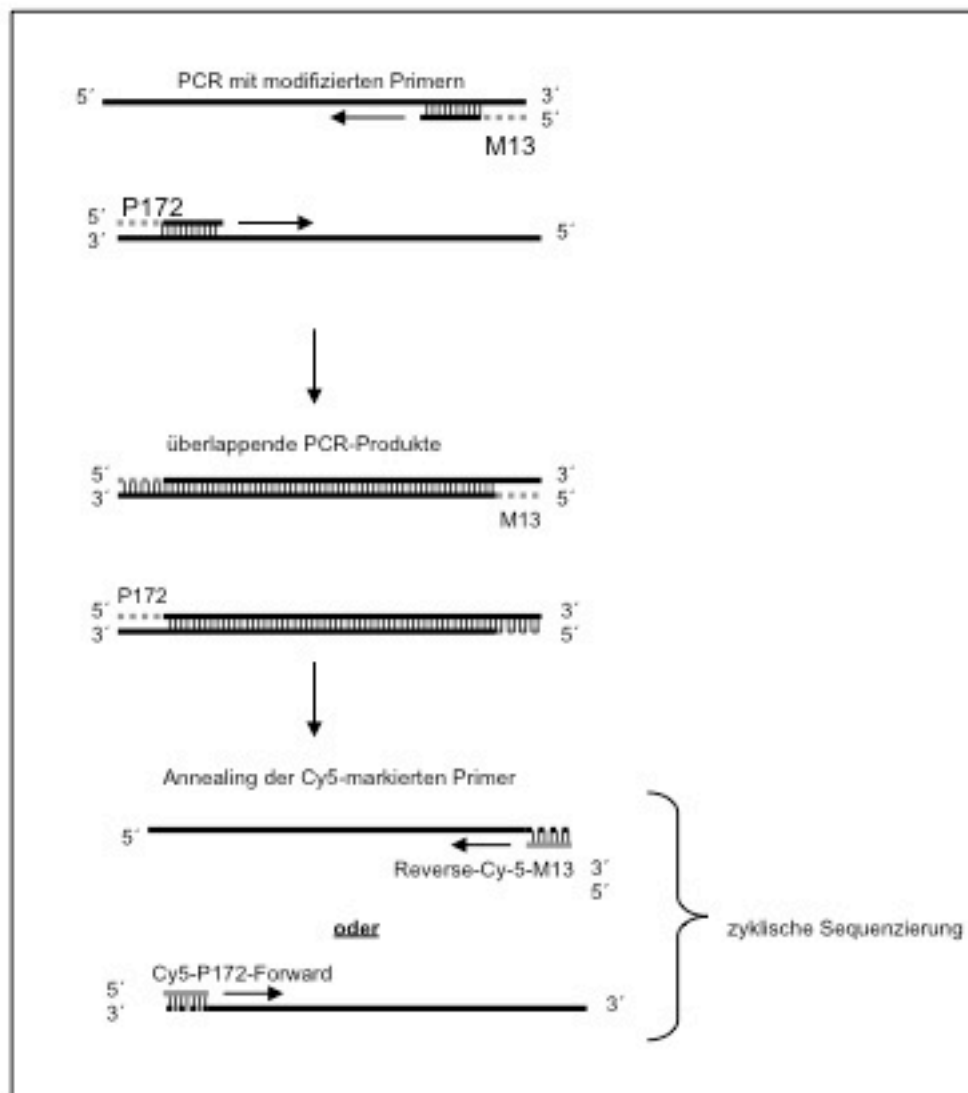


Abbildung 2-6 Prinzip der Fluoreszenzmarkierung mittels spezieller Primer

Da sowohl der Forward- als auch der Reverse-Primer um diesen für die Sequenzierprimer benötigten Hybridisierungsabschnitt verlängert wird, können nach der Sequenzreaktion also sowohl der kodierende (*sense*) Strang als auch der nicht-kodierende (*anti-sense*) Strang analysiert werden. Dies dient der Verifizierung der Ergebnisse, hier insbesondere der Bewertung, ob es sich in der Sequenzdarstellung um ein methodisches Artefakt handelt oder

tatsächlich um eine veränderte Basensequenz. Korrespondierende Basenveränderungen in *sense* und *anti-sense* Strängen schließen einen Artefakt hinreichend sicher aus.

Primermodifikation	5'-3'-Sequenz
P172 (für Forward-Primer)	TAT TAT AGG GCG AAT TGG GT
M13 (für Reverse-Primer)	TAT GTA AAA CGA CGG CCA GT

Tabelle 2-1: Primermodifikation

Nachdem die PCR mit den modifizierten Primer durchgeführt und ausgewertet wurde, müssen die PCR-Produkte für den nächsten Schritt der Sequenzreaktion gereinigt werden. Dies geschieht mit Hilfe von MikroSpin-Säulen, die vornehmlich störende Primerreste und dNTPs entfernen und den Salzgehalt verringern. Hierzu wird die Säule in TE-Puffer reäquilibriert und für eine 1 Minute bei 3000 Upm zentrifugiert. Das Zentrifugat wird verworfen. Die Säule wird danach mit dem PCR-Produkt beladen und für eine weitere Minute bei 3000 Upm zentrifugiert, wobei die DNA in einem Eppendorf-Röhrchen aufgefangen wird. Jetzt folgt die eigentliche zyklische Sequenzreaktion, in der die universellen Primer am jeweiligen Strang binden und diesen im 5'-Bereich mit dem langwelligen Farbstoff Cyanin-5 (Cy5) markieren. Anschließend kann die DNA-Neusynthese bis zum Kettenabbruch durch ein ddNTP erfolgen. Für jede Sequenzreaktion werden vier Reaktionsgemische angesetzt. Jeder Ansatz enthält ein Endvolumen von 8 µl: je 1 µl PCR-Produkt; 4,5 µl DEPC-H₂O; 0,5 µl (ca. 0,156 µM) Sequenz-Primer (P172-Cy5 oder M13-Cy5, siehe Tabelle 2-2) und je 2 µl Reagenz A, C, G oder T.

Primer	Name	5'-3'-Sequenz
Forward	P172-Cy5	TAT AGG GCG AAT TGG GT
Reverse	M13-Cy5	GTA AAA CGA CGG CCA GT

Tabelle 2-2: Sequenzprimer

In jedem Reaktionsgefäß sind dementsprechend alle dNTPs und entsprechend dem gewählten Reagenz entweder ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP und Thermo-Sequenase- DNA-Polymerase enthalten.

Im nächsten Schritt werden die Reaktionsgemische der definitiven Sequenzreaktion zugeführt, indem sie unter folgenden Bedingungen inkubiert werden: Initial erfolgt ein Denaturierungsschritt für 3 Minuten bei 95°C, gefolgt von 26 Zyklen aus Denaturierung für 30 Sekunden bei 95°C, Annealing und Elongation für je 30 Sekunden bei 65°C. Anschließend werden zur jeder Probe 4 µl Formamid loading dye pipettiert, welche den Ansatz rot-violett färben und später die DNA-Einzelstränge bei der Gelelektrophorese stabilisieren.

Für die Gelelektrophorese werden 60 ml einer sechsprozentigen Polyacrylamid-Lösung angesetzt. Daraufhin pipettiert man 480 µl APS, um die Polymerisation zu initiieren, also die Quervernetzung der Moleküle. Diese Gellösung wird in eine Standard-Gel-Einheit des automatischen Sequenzierers auf eine Dicke von 0,5 mm gegossen. Nach zwei Stunden ist das Gel auspolymerisiert. Die Gel-Einheit wird in den Sequenzierautomaten gehängt, so dass die Gelbrunnen mit den vorbereiteten Proben befüllt werden können, wobei die Reihenfolge von links nach rechts A, C, G, T beachtet werden muss. Nach Anlegen der Elektroden wird die denaturierende Elektrophorese unter Verwendung eines TBE-Puffers durchgeführt. Die Denaturierung der DNA-Moleküle beruht auf dem im Polyacrylamidgel enthaltenen Harnstoff, während das auspolymerisierte Gel eine Trennung der DNA-Fragmente abhängig von ihrer Grösse bewirkt, also im Sinne eines "Molekularsiebs" und in Analogie zum Agarosegel (siehe 2.4). Die 12 Stunden dauernde Trennung der Fragmente erfolgt bei 1500 V, 38 mA und 34 W. Die fluoreszierenden Fragmente werden von einem (senkrecht zur Laufrichtung) am Ende des Gels befindlichen Helium-Neonlaser (Wellenlänge: 632,8 nm/ Energie 2,5 mV) angeregt; das emittierte Licht wird von Detektordioden quantitativ erfasst und computergestützt digitalisiert, gespeichert und ausgewertet [57] (siehe Abb.2-7).

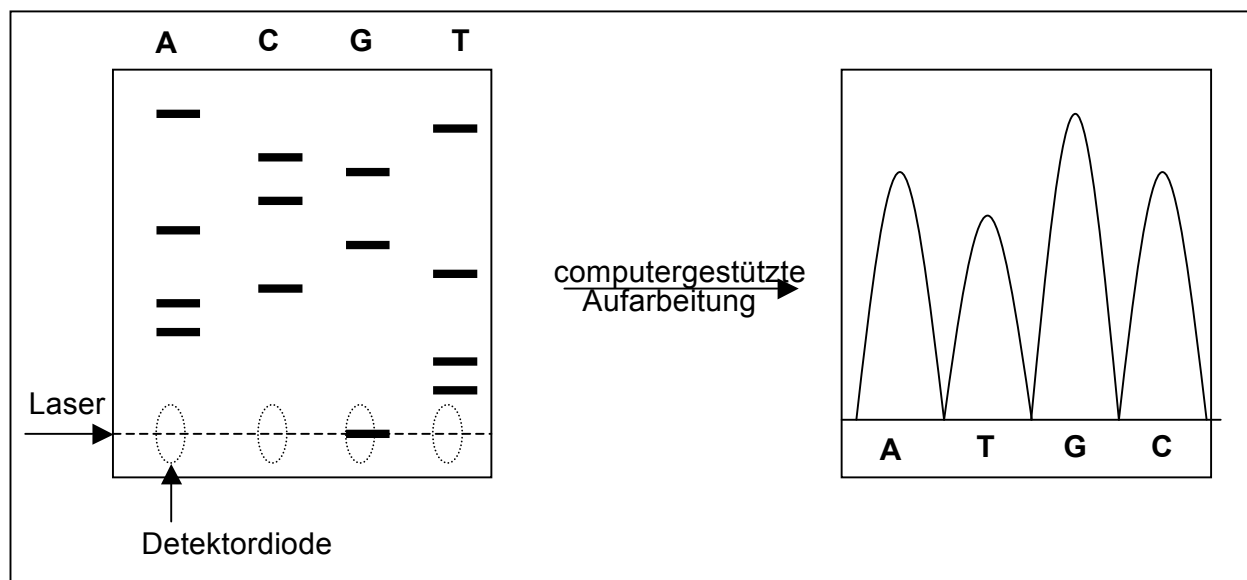


Abbildung 2-7: schematische Darstellung der computergestützten Aufarbeitung der DNA-Sequenzierung

2.7.4 Auswertung

Nach Beendigung des Laufes erfolgt die Auswertung mit Hilfe der AM V3.0 Software, womit die Rohdaten erfasst, analysiert und prozessiert werden können. Hiermit werden die Fragmentreihen automatisch zu einer fortlaufenden Basensequenz integriert. Zunächst werden die Daten der Wildtyp-Sequenz einer mitgeführten Kontrolle durch Vergleich mit der publizierten Originalsequenz ausgewertet, um die einwandfreie Durchführung des Sequenzierablaufs zu kontrollieren und gegebenenfalls systemische Fehler zu erfassen. Im nächsten Schritt wird die Patientensequenz auf Veränderungen gegenüber der Kontrollsequenz untersucht. Die verschiedenen Mutationen bieten ihr jeweiliges charakteristisches Bild: Punktmutationen können sich als Deletionen und Insertionen präsentieren und zeigen sich dementsprechend durch das Fehlen oder Einfügen einer Base, was zu einer sogenannten Leserasterverschiebung führt (*frameshift*). Substitutionen manifestieren sich durch einen Basenaustausch und können sich in Form von Transitionen (Austausch von Purinbasen bzw. Pyrimidinbasen untereinander) oder Transversionen (Austausch von Purin- durch Pyrimidinbase bzw. umgekehrt) präsentieren. Nach Feststellen einer Mutation ist es wichtig, die Zygotität der Mutation zu bestimmen. Diese Unterscheidung zwischen homozygot und heterozygot ist möglich, da im Sequenzierverlauf in der Regel beide elterlichen Chromosomen transkribiert werden. Homozygotie zeigt sich durch eine identische Basensequenz unter Einschluss der Mutation auf beiden Allelen,

während bei Heterozygotie nur ein Allel die Mutation trägt und das andere elterliche Allel der Wildtypsequenz entspricht.

Um nach Ausschluß eines Polymorphismus (s. oben) weitere Argumente für die Pathogenität der Mutation zu finden, können Überlegungen zu den funktionellen Auswirkungen angestellt werden. Ein Argument liegt in der Natur der Mutation, das heißt, bei einer *frameshift*-Mutation kommt es zur Synthese eines nonsense-Proteins mit einem häufig verfrühten Abbruch der Proteinsynthese an einem neu generierten Stopcodon. Bei substanziellem Verlust von C-terminalen Molekülanteilen ist die deletäre Wirkung auf die NCCT-Funktion gut vorstellbar. Bei Punktmutationen durch Basensubstitution hingegen muss ermittelt werden, ob es zu einem relevanten Aminosäureaustausch kommt. Dies prüft man im sogenannten Alignment des NCCT. Das Alignment über Speziesgrenzen hinweg zeigt an, ob Aminosäuren-Positionen in der Familie der elektroneutralen Kation-Chlorid-Kotransporter konserviert sind. Hochkonservierte Aminosäure-Positionen implizieren eine wichtige Bedeutung für die Proteinfunktion. Von einer Basensubstitution in diesem Bereich kann auf einen deletären Effekt in der Funktion des Transportmoleküls geschlossen werden. Den sichersten Hinweis auf den pathogenen Effekt einer Mutation geben schließlich *In-vitro*-Studien von Mutationen. Geläufig ist die heterologe Expression in *Xenopus*-Oozyten oder Säugetier-Zelllinien.

2.8 Kopplungsanalyse mittels Mikrosatelliten

2.8.1 Beschreibung

Die Kopplungsanalyse ist ein molekulargenetisches Verfahren, mit dem man die Transmission zweier benachbarter chromosomaler Loci zwischen den Generationen untersucht. Eine Kopplung von 2 Genen bedeutet, dass sie gemeinsam vererbt werden, also relativ nahe beieinander auf demselben Chromosom liegen, so dass sie nicht durch ein *crossing-over* (Austausch von genetischem Material zweier homologer Chromatiden) in der Prophase der Meiose voneinander getrennt werden, wie es bei der Rekombination der Fall ist. Dies lässt sich am besten auf der Ebene der Gametogenese verstehen (siehe Abb.2-8).

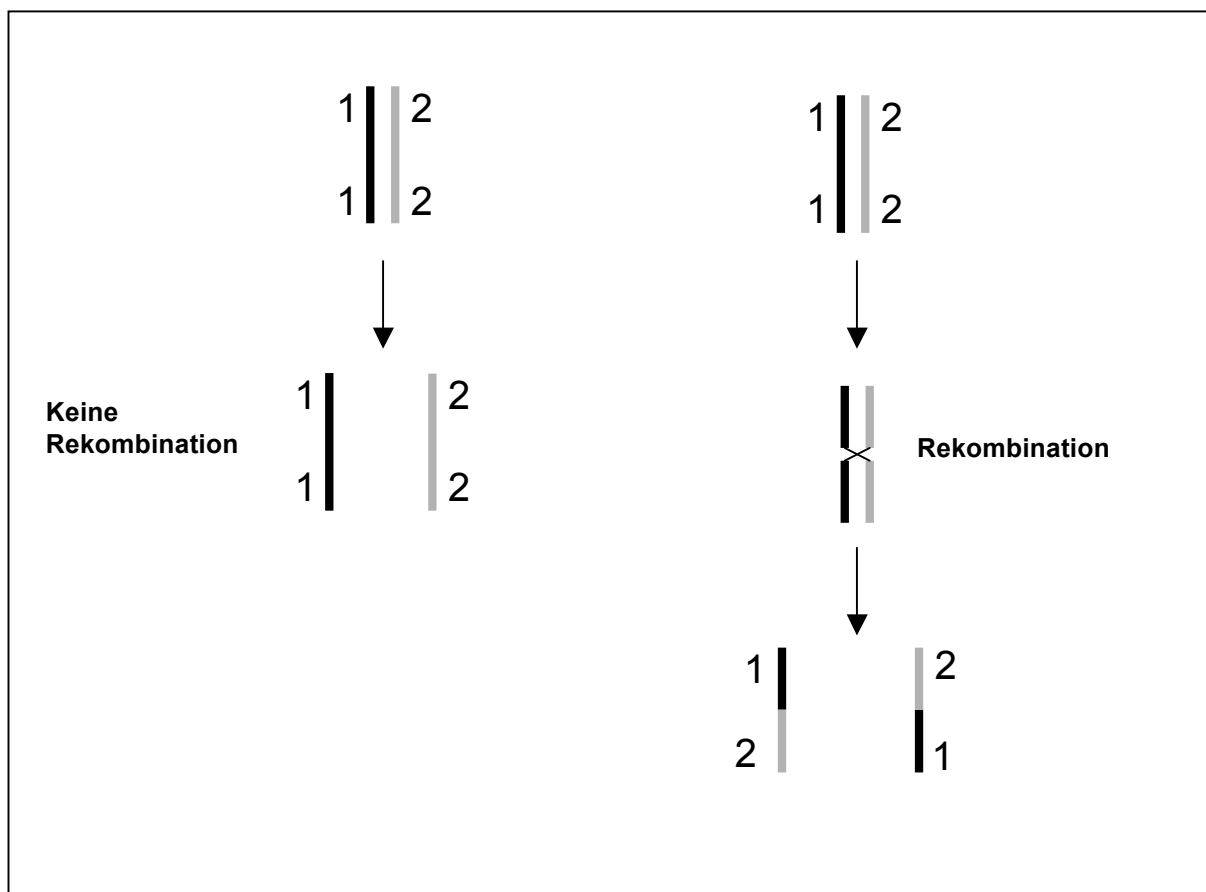


Abbildung 2-8 Rekombination

Mit Hilfe der Kopplungsanalyse können Segregationsanalysen definierter genetischer Marker durchgeführt werden. Hier handelt es sich um die Beobachtung einer eventuellen Kosegregation (gemeinsame Vererbung) von polymorphen genetischen Markern mit einem bestimmten Phänotyp. Diese können Aufschluss darüber geben, ob ein bestimmtes Kandidatengen den Phänotyp hervorzubringen vermag. Dabei können verschiedene Sequenz-Polymorphismen genutzt werden; im Falle der vorliegenden Arbeit wurde der Mikrosatelliten-Polymorphismus genutzt [97]. Mikrosatelliten sind repetitive DNA-Einheiten, welche aus 10-50 Kopien von Folgen aus 1-6 Basenpaaren bestehen, die direkt hintereinander folgen. Sie bestehen aus einer einfachen Sequenz, beispielsweise dem häufigen $(CA)_n$ -Dinukleotid-Repeat. Bedeutend für die Analyse ist, dass die Zahl der Dinukleotid-Einheiten hoch polymorph ist, d.h. zwei Allele unterscheiden sich mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Anzahl dieser Einheiten. Solche Mikrosatelliten sind diffus, das heißt in ca. 30 kb-Abständen in das menschliche Genom eingestreut. Eine große Zahl von ihnen ist bereits in der Literatur beschrieben. Sie können über Genbanken ermittelt werden [23].

Es werden nun verschiedene Mikrosatelliten in unmittelbarer Nachbarschaft des Kandidatengens *SLC12A3* ausgewählt, dessen Kosegregation mit dem Phänotyp Gitelman-

Syndrom, insbesondere aber mit dem cBS-Phänotyp untersucht wurde. Hierzu eignen sich in dem vorliegenden Patientenkollektiv acht Familien, sog. *informative* Familien. Sie zeichnen sich durch Konsanguinität der Eltern bzw. durch zahlreiche Kinder, erkrankte und nicht erkrankte (sogenannte Multiplex-Familien) aus. Ziel der Untersuchung ist es, die Segregation der gewählten Marker innerhalb dieser Familien zu beobachten und die entsprechenden Haplotypen zu erstellen. Eng benachbarte Genmarker, die nicht durch Rekombination getrennt wurden und über Generationen vererbt werden, können quantitativ anhand ihrer Polymorphismen klassifiziert werden. Hiernach kann die Beteiligung des *SLC12A3*-Gens an dem vorhandenen Phänotyp entweder bereits ausgeschlossen oder aber bei positiver Kosegregation postuliert werden.

Die polymorphen Marker (Mikrosatelliten) werden mittels PCR amplifiziert und mit Hilfe eines hochauflösenden Polyacrylamid-Gels der Größe nach aufgetrennt. Die nun detektierten Fragmente entsprechen den vererbten Allelen und lassen eine Verteilung der parentalen Allele auf die Nachkommen zu (siehe Abb.2-9)

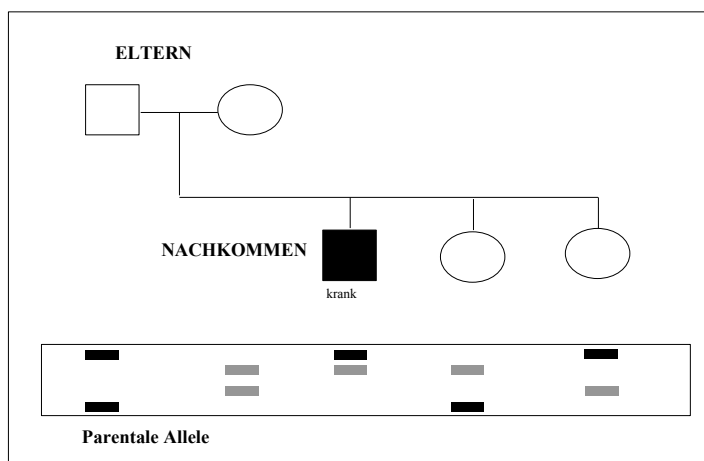


Abbildung 2-9: Segregation eines polymorphen DNA-Markers. Allele unterscheiden sich durch Länge der Dinukleotid-Folgen. Eltern sind heterozygot. Jedes Kind erbt je ein Allel der Eltern

2.8.2 Material

2.8.3 Geräte

- Sequencer ALF®express (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
Elektrophorese-Set: Heizplatte (short), Glasplatte (short), Spacer (0,3 mm), Kamm (0,3 mm)
- Fragment Manager™ V1.0 Software (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)

2.8.4 Chemikalien

- Sequagel™-Kit Kat.Nr.900000 (Fa.Biozym, Hess.Oldendorf)
enthält

Sequagel-Konzentrat	25% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid 19:1 8,3 M Harnstoff
Sequagel-Verdünner	deionisiertes H ₂ O 8,3 M Harnstoff
Sequagel-Puffer	1 M Tris-Borat 20 mM EDTA, pH 8,3 8,3 M Harnstoff
- Ammoniumpersulfat Kat.Nr. A-3678 (Fa.Sigma, Deisenhofen)
- TEMED Kat.Nr. M201.16 (Fa.GATC, Konstanz)
- Allelic base-pair ladder 50-500 Kat.Nr. 27-4539-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Formamid Loading dye (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Sizer 150 Kat.Nr. 27-4535-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Sizer 250 Kat.Nr. 27-4537-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Sizer 300 Kat.Nr. 27-4531-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Oligonukleotid-Primer (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- TBE-Puffer 0,6x

2.8.5 Durchführung

Die Basensequenz der Mikrosatelliten, welche den Genlocus des *SLC12A3*-Gens (16q13) proximal und distal flankieren (D16S419, D16S408, D16S3140, D16S494, D16S3089, D16S514), werden einer Publikation entnommen und entsprechende Oligonukleotid-Primer für deren Amplifikation synthetisiert [23]. Die Fragmentlängenbestimmung wird mit dem automatischen Sequencer durchgeführt, so dass wir zur Rotlichtlaser-Detektion der Fragmente Cyanin-5 markierte Forward-Primer verwenden (siehe auch 2.7.3). Alle verfügbaren Mitglieder der informativen Familien wurden in die Kopplungsanalyse eingeschlossen. Die PCR-Amplifikation der Mikrosatelliten erfolgte direkt von genomischer DNA. Für den elektrophoretischen Lauf der Fragmente werden 1µl PCR-Produkt mit Formamid loading dye versetzt. Zur Fragmentlängenbestimmung in der Gelelektrophorese werden zwei Arten von Längenstandards mitgeführt: zum einen ein externer Standard, eine Basenleiter von 50-500 bp, zum anderen ein interner Standard, der je nach der zu erwartenden Fragmentlänge in jeder Probe mitgeführt wird. Hierzu wählt man zwei längendefinierte Fragmente, die die Probe flankieren, meist 150 bp und 300 bp. Diese sogenannten Sizer werden vorher mit Formamid

loading dye im Verhältnis 1:40 vermischt und haben somit in jeder Probe eine standardisierte Konzentration. Vor der Elektrophorese wird die doppelsträngige DNA der Proben noch 5 min bei 95°C zu einzelsträngiger DNA denaturiert.

In der Zwischenzeit wird das Gel für die Elektrophorese gegossen. Hierzu werden 30 ml 12%iger Polyacrylamid-Lösung angesetzt, bestehend aus 14,4 ml Konzentrat mit 12,6 ml Verdünner und 3 ml Puffer. Unter Zugabe von 16 µl TEMED und 170 µl APS kann das Gel auspolymerisieren. Das Gel selbst wird in einer Gelkassette auf 3mm Dicke gegossen und für 2 Stunden ruhen gelassen. Anschließend wird die Gelkassette in den automatischen Sequencer gehängt und die Proben können der Reihe nach aufgetragen werden. Die denaturierende Gelelektrophorese wird mit TBE-Puffer bei 1500 V, 38 mA und 34 W über 12 Stunden durchgeführt. Die Detektion der Fragmentlängen funktioniert nach demselben Prinzip wie bei der Sequenzierung mittels Rotlichtlaser, das heißt, der Farbstoff Cyanin-5 am 5'-Ende der Fragmente wird von dem Rotlichtlaser angeregt und die emittierte Energie von Photodioden detektiert. Anschließend werden die Daten digitalisiert und können durch die Software bearbeitet und ausgewertet werden.

2.8.6 Auswertung

Die Auswertung des Laufes erfolgt computergestützt mit der Fragment-Manager™-V1.0-Software. Die Läufe der einzelnen Proben werden einander gegenübergestellt und die Fragmentlängen rechnerisch abgeglichen. Nun ermittelt man die Länge der einzelnen parental Allele und trifft eine Aussage über Homozygotie bzw. Heterozygotie. Sodann ermittelt man, wie sich diese Allele auf die Nachkommen verteilen. Die Allele jedes Markers werden für jedes Familienmitglied notiert, so dass sich daraus Haplotypen erstellen lassen. Zur besseren Übersicht wird jedem Allel innerhalb eines Markers eine Zahl zugewiesen, wobei das kürzeste Allel die kleinste Zahl und das längste Allel die größte Zahl erhält.

3 Ergebnisse

3.1.1 Phänotyp- Daten

28 Patienten aus 22 voneinander unabhängigen Familien wurden in die Untersuchung eingeschlossen. Neunzehn Patienten zeigen das typische laborchemische Bild des GS, vier Patienten entsprechen den Kennzeichen des cBS. Bei den verbleibenden fünf Patienten ist eine eindeutige Zuordnung aufgrund unvollständiger klinischer Angaben nicht möglich.

Tabelle 3-1 fasst die Phänotyp-Merkmale zusammen. In vier Familien war anamnestisch Konsanguinität bekannt, bei drei weiteren Familien (mit insg. 6 Patienten) lassen die Befunde der Haplotypen-Untersuchung auf Blutsverwandtschaft der Eltern schließen. Aus den sechs Multiplex-Familien mit je zwei betroffenen Geschwistern verhielten sich in fünf Familien die Geschwister bzgl. des Phänotyps konkordant. In einer Familie allerdings waren die beiden Geschwister (7576/7) diskordant, je eins präsentierte das Gitelman-Syndrom, das andere das klassische Bartter-Syndrom.

Tabelle 3-1

	7221	7222	7610	7611	7612	7609	7622	7139	7140	7471	7472	7624	7242	7243	7396
Hypokaliämie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
metabol. Alkalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hypomagnesiämie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hypokalziurie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Renin-Erhöhung	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
Aldosteron-Erhöhung	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
Konsanguinität	(+)	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø	+	+	+	-	-	Ø	-	-	-
Nationalität	G	G	G	G	G	G	T	T	T	CH	CH	D	B	B	D
Polyhydramnion	-	-	-	-	-	-	Ø	-	Ø	-	-	Ø	-	-	Ø
Frühgeburtslichkeit	-	-	-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	Ø	-	-	Ø
Iso-/Hypostenurie	Ø	Ø	-	Ø	-	-	Ø	-	Ø	-	-	Ø	-	-	-
Nephrokalzinose	-	-	-	-	-	-	Ø	-	Ø	-	-	Ø	-	-	-
Wachstumsstörung	-	-	+	Ø	Ø	Ø	+	-	Ø	-	-	Ø	-	-	Ø
Salzhunger	Ø	Ø	Ø	+	+	+	Ø	+	Ø	+	+	+	+	+	Ø
Klinische Symptome	Ø	Ø	EGe	Ø	Ø	Ø	MK	Lab	Lab	MK	Lab	Ø	Ø	Ø	Lab
Alter bei Erstmanifestation	Ø	Ø	1 M	5,5J	8J	8,5J	Ø	2,5J	Ø	14J	9J	23J	Ø	Ø	21J
Phänotyp	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS

+ Merkmal erfüllt; - Merkmal nicht erfüllt; Ø keine Angaben; CH Schweiz; I Israel; D Deutschland; B Belgien; T Türkei; G Gipsy; S Spanien; J Lebensjahr; M Lebensmonat; GS Gitelman Syndrom; cBS klassisches Bartter Syndr., cBS/GS unklarer Phänotyp, EGe Erbrechen u. Gedeihstörung, Lab Labordiagnose bei interkurierendem Infekt/präoperativ/Screening bei betroffenem Geschwister, MK Muskelkrämpfe, ND neurologische Erkrankung

	7293	7294	7470	7576	7577	7542	7603	7606	7381	7430	7427	F584II	7549
Hypokaliämie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hypomagnesiämie	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	Ø
metabol. Alkalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hypokalziurie	+	+	+	+	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Renin-Erhöhung	+	+	+	+	-	+	+	Ø	+	+	+	+	+
Aldosteron-Erhöhung	+	+	-	+	-	-	+	+	Ø	-	-	+	+
Konsanguinität	(+)	(+)	Ø	(+)	(+)	-	Ø	Ø	+	-	-	Ø	Ø
Nationalität	T	T	T	I	I	D	D	I	T	S	S	D	D
Polyhydramnion	Ø	Ø	-	-	-	-	Ø	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø
Frühgeburtlichkeit	Ø	Ø	-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	Ø	Ø
Iso-/Hyposthenurie	Ø	Ø	-	-	-	-	Ø	-	Ø	-	-	Ø	Ø
Nephrokalzinose	-	-	-	-	-	-	-	-	Ø	-	-	Ø	Ø
Wachstumsstörung	-	+	+	+	-	+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Salzhunger	+	+	+	+	+	+	Ø	+	+	Ø	+	+	Ø
Klinische Symptome	MK	MK	ND	EGe	Lab	EGe	Ø	Lab	Lab	Lab	MK	Lab	Ø
Alter bei Erstmanifestation	8J	12J	5J	2,5J	8,5J	3 J	Ø	1,5J	8J	Ø	20 J	1,5J	Ø
Phänotyp	GS	GS	GS	GS	cBS	cBS	cBS	cBS	cBS/GS	cBS/GS	cBS/GS	cBS/GS	cBS/GS

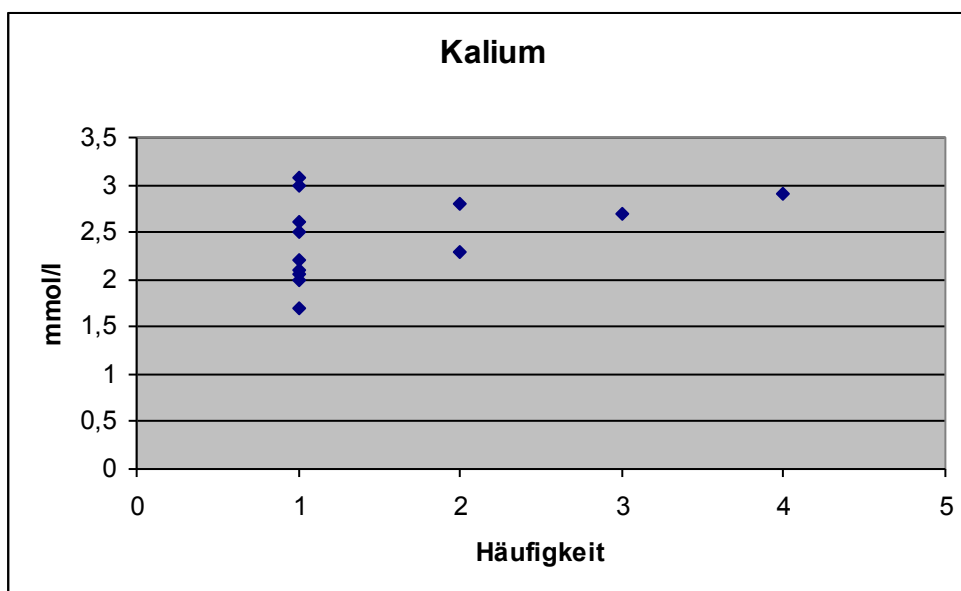
Weil Einschlusskriterium, war die hypokaliämische Alkalose obligat. Bei 19 von 28 Patienten war die Hypomagnesiämie koinzident mit einer Hypokalziurie, sie trafen damit Bettinellis Definition des GS [7]. Bei den übrigen 9 Patienten lagen Hypokalziurie oder Hypomagnesiämie isoliert vor oder die Daten waren unvollständig. Insbesondere die renale Calcium-Ausscheidung war nur rudimentär dokumentiert. Lagen die Angaben zu beiden Parametern vor, wurden die Patienten als cBS klassifiziert (n=4). Diese Gruppe war mit Blick auf die mögliche variable Phänotyp-Expression von *SLC12A3* Mutationen besonders interessant, und auch der Einschluss wenigstens einer Multiplex-Famillie mit diskordantem Phänotyp war in dieser Richtung ermutigend.

Wenn dokumentiert, war der Schwangerschaftsverlauf bei allen Patienten unauffällig, insbesondere trat kein Polyhydramnion auf. Dort wo angegeben, war in der Regel auch eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems nachweisbar. Die renale Konzentrationsfähigkeit, beurteilt am ersten Morgenurin, war nicht beeinträchtigt, eine medulläre Nephrokalzinose, typisch für den Salzverlust vom Furosemid-Typ, konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.

Auf die Laborparameter Serum-Kalium und -Magnesium und die Kalziumausscheidung im Urin sowie Alter bei Erstmanifestation und Wachstumsstörungen wird im Folgenden detaillierter eingegangen.

3.1.1.1 Hypokaliämie

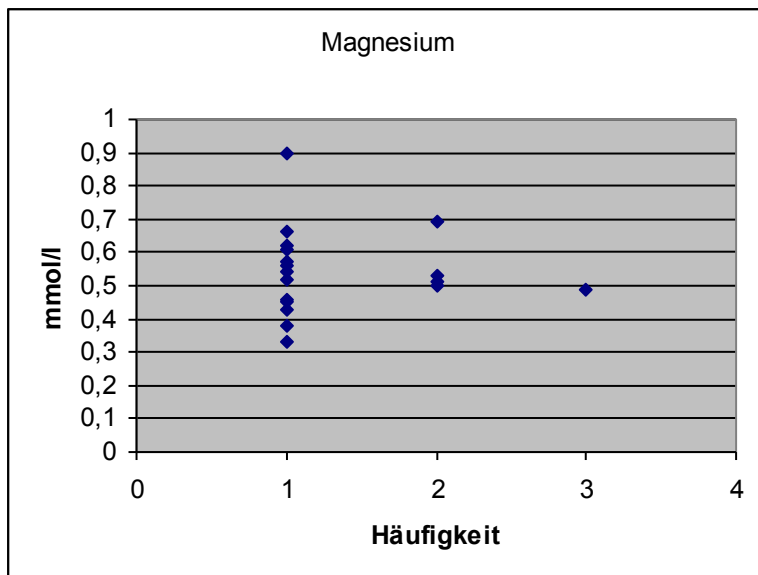
Bei 20 von 28 Patienten lagen Angaben zu der niedrigsten Serum-Kaliumkonzentration bei Diagnosestellung (als Zahlenwert) vor. Bei den übrigen acht Patienten wurde lediglich Hypokaliämie dokumentiert. Das Ausmaß der Hypokaliämie variierte zwischen 1,7 mmol/l und 3,08 mmol/l, der Median lag bei 2,7 mmol/l (siehe Abb.).



Kalium (mmol/l)		
N	gültig	20
	fehlend	8
Mittelwert		2,56
Median		2,7
Standardabweichung		0,38
Minimum		1,7
Maximum		3,08

3.1.1.2 Hypomagnesiämie

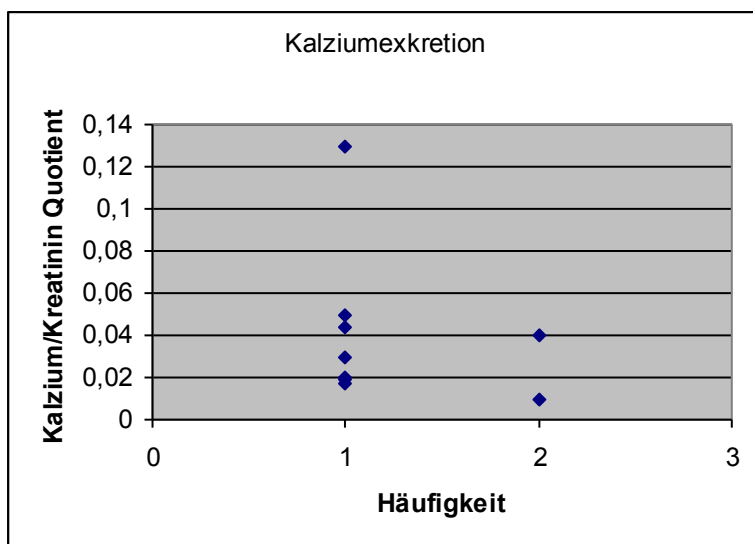
Eine Hypomagnesiämie, definiert als S-Magnesium <0,65 mmol/l, wurde bei 23 von 28 Patienten angegeben. Bei 19 von 23 Patienten war der Wert bei Diagnosestellung nominell erfasst, bei den übrigen wurde lediglich die Hypomagnesiämie positiv beantwortet. Ein normales Serum-Magnesium bei Diagnose-Stellung hatten vier Patienten allerdings ohne Angabe des exakten Zahlenwertes. Bei einem weiteren Patienten gab es keinerlei Angaben zum S-Magnesium. Die niedrigst gemessenen S-Magnesium-Werte im Gesamt-Kollektiv schwankten zwischen 0,33 mmol/l und 0,9 mmol/l, der Median lag bei 0,51 mmol/l (siehe Abb.).



Magnesium (mmol/l)		
N	gültig	22
	fehlend	6
Mittelwert		0,54
Median		0,51
Standardabweichung		0,0954
Minimum		0,33
Maximum		0,9

3.1.1.3 Hypokalziurie

Die Hypokalzurie wurde nur selten als Kalziumausscheidung im 24 Stunden-Sammelurin erfasst. Alternativ wurde die molare Kalzium/Kreatinin-Ratio als Parameter der renalen Kalziumexkretion herangezogen. Hypokalziurie ist definiert als molare Kalzium/Kreatinin-Ratio $<0,1$ [7]. Insgesamt 20 Patienten wurden von ihren behandelnden Ärzten als hypokalziurisch eingestuft (14 Patienten mit direkter Angabe der Ca/Krea-Ratio). Vier Patienten wiesen eine normale renale Kalzium-Ausscheidung auf (1 Patient mit direkter Angabe der Ca/Krea-Ratio). Bei vier Patienten fehlten jegliche Angaben zur Kalziumausscheidung. Im Median betrug der Quotient für alle Patienten 0,0145 mit einem Minimum bei 0,008 und einem Maximum bei 0,13 (siehe Abb.).



Kalziumexkretion (Ca/Krea-Quotient mol/mol)		
N	gültig	15
	fehlend	13
Mittelwert		0,0294
Median		0,0145
Standardabweichung		0,0045
Minimum		0,0008
Maximum		0,13

3.1.1.4 Alter und Symptome bei Erstmanifestation

Bei der Taxierung des Alters bei Erstmanifestation wurde nicht zwangsläufig nach dem Zeitpunkt der Diagnosestellung, sondern nach dem Erstauftreten von krankheitsassoziierten Symptomen gefragt. Bei gut zwei Dritteln der Gesamtkohorte lagen entsprechende Angaben vor. Frühester Manifestationszeitpunkt des tubulären Salzverlusts lag bereits im ersten Lebensmonat, verbunden mit Erbrechen und Gedeihstörung. Im anderen Extrem fielen auch nur die typischen Laborveränderungen innerhalb einer präoperativen Routineblutuntersuchung zu Mitte der dritten Lebensdekade auf. Der Median des Alters bei Erstmanifestation lag aber deutlich darunter bei 6,5 Jahren (siehe Abb.). Die Diagnose basierte im Wesentlichen auf der pathognomonischen Laborkonstellation. Diese wurde nicht selten zufällig in Routineuntersuchungen aufgedeckt, z.B. im Rahmen eines interkurrenten Infekts (n=6), während der Operationsvorbereitung (n=1) oder in der Abklärung eines Anfallsgeschehens (n=1). Zwei asymptomatische Geschwisterkinder wurden lediglich durch die Familienuntersuchung detektiert. Die klassischen muskulären Symptome von Muskelkrämpfen bis hin zu Tetanien sind in fünf Fällen beschrieben. Drei Patienten wurden

bereits früh (zwischen dem 1. Lebensmonat und dem 3. Lebensjahr) mit einer Gedeihstörung und Erbrechen symptomatisch. Salzhunger als subjektives Symptom wurde bei der Mehrheit der Patienten angegeben (19/28), interessanterweise allerdings nur auf Nachfrage. Von den Patienten selbst wird dieser kaum als Krankheitssymptom wahrgenommen.

Erstmanifestation (Jahre)		
N	gültig	19
	fehlend	9
Mittelwert		8,5
Median		6,5
Standardabweichung		6,91
Minimum		0,08
Maximum		23

3.1.1.5 Wachstumsstörung

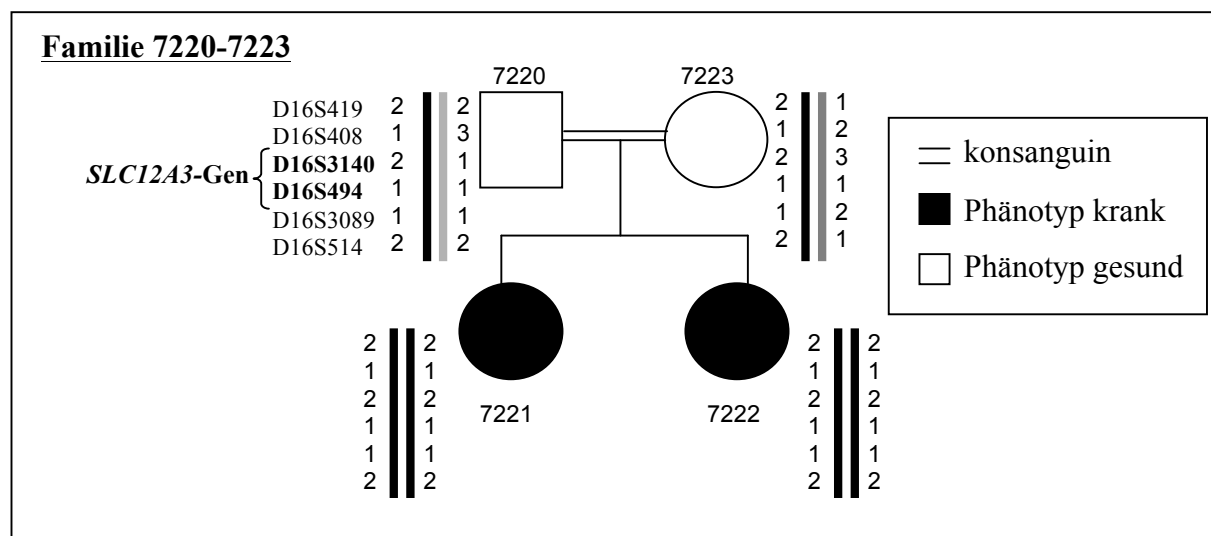
Angaben zur Körpergröße lagen zu 17 Patienten vor, bei fast der Hälfte der Patienten lag zum Zeitpunkt der Datenaufnahme ein Kleinwuchs vor, definiert als Körpergröße < 3. Perzentile. Da das Körperlängen-Wachstum durch den Fragebogen rein qualitativ abgefragt wurde, stehen keine longitudinalen Daten zum Wachstumsverlauf zur Verfügung. Allerdings deckte die weitere diagnostische Abklärung von zwei Patienten einen hypophysären Wachstumshormon-Mangel auf.

3.1.2 Ergebnisse der Kopplungsanalyse

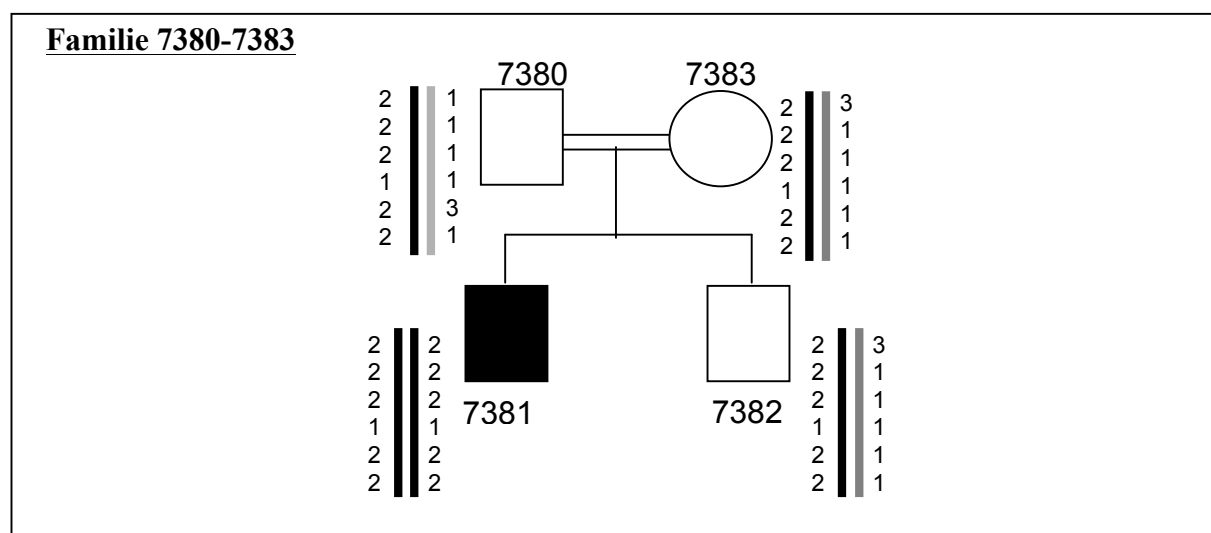
Acht Familien waren informativ (3 konsanguin (nach Anamnese), 6 multiplex) und wurden in die Kopplungsanalyse eingeschlossen. Folgende- den *SLC12A3*-Lokus flankierenden polymorphen Marker, sog. Mikrosatelliten- wurden eingesetzt: D16S419, D16S408, D16S3140, D16S494, D16S3089 und D16S514. Die beiden nächsten Marker zum *SLC12A3*-Lokus sind D16S3140 und D16S494.

Familie 7220-7223 – Die Familie besteht aus einem klinisch unauffälligen, anamnestisch nicht-blutsverwandten Elternpaar mit zwei am GS erkrankten Kindern. Die beiden Kinder erben die identischen Haplotypen der jeweiligen Elternteile und sind für alle polymorphen Marker homozygot. Der Befund ist vereinbar mit einer Kopplung der Erkrankung an das *SLC12A3*-Gen. Die Familie stammt aus dem Kulturkreis der Sinti mit hoher Prävalenz von Verwandtenehen. Da die Eltern tatsächlich je ein identisches Allel auf Chromosom 16q13

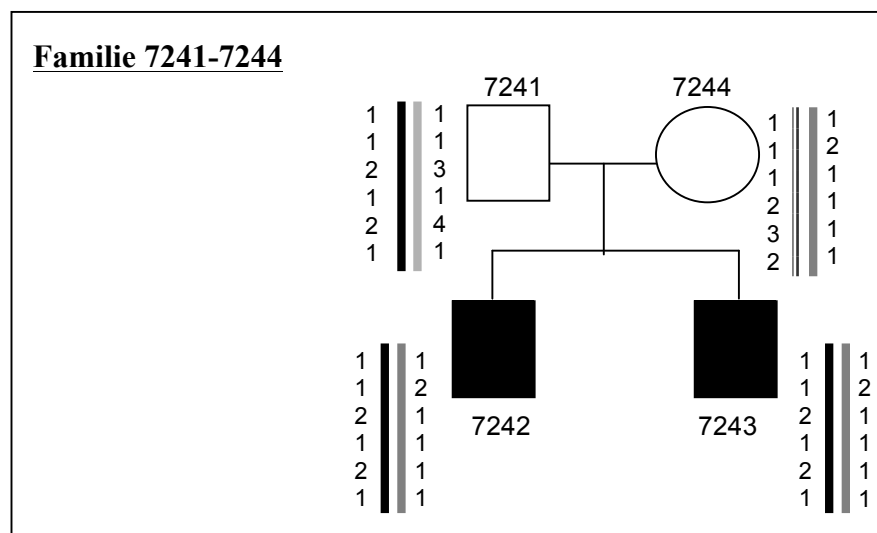
besitzen, das den *SLC12A3*-Lokus einschließt, kann man in diesem Fall von einer konsanguinen Ehe oder wenigstens einem *founder*-Effekt ausgehen. Bei beiden Patienten konnte eine homozygote Mutation im *SLC12A3*-Gen detektiert werden (siehe Kap 3.1.4).



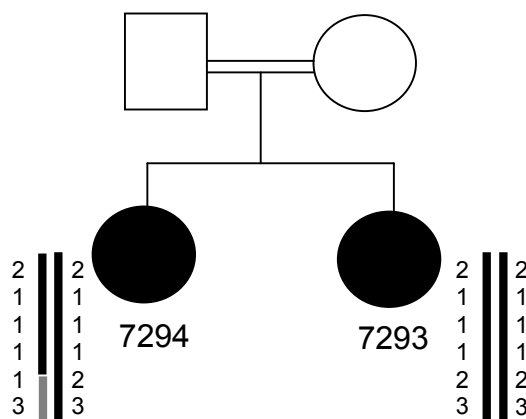
Familie 7380-7383 – Es handelt sich um eine türkische Familie mit Verwandtschaftsbeziehung 2. Grades. Die Eltern sind Cousin und Cousine. Aus der Ehe gehen zwei Söhne hervor, einer hat die renale Salzverlust-Erkrankung, der andere ist gesund. Die Erkrankung kosegregiert mit den beiden identischen elterlichen Haplotypen. Der erkrankte Sohn ist über den gesamten untersuchten Bereich hinweg homozygot, während sein Bruder das andere mütterliche 16q13 Allel erbt. Letzterer besitzt damit einen Überträger-Status, ist selbst aber gesund. Dies ist typisch für die autosomal-rezessive Transmission der Erkrankung. In der Sequenzierung zeigt das erkrankte Kind eine homozygote Mutation im *SLC12A3*-Gen.



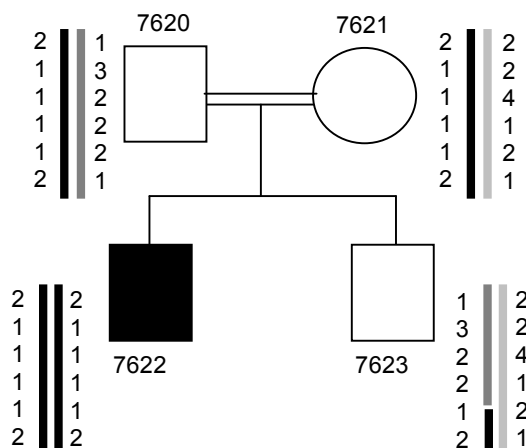
Familie 7241-7244 – Es handelt sich um eine belgische Multiplex-Familie. Die beiden Kinder zeigen typische GS-Symptome. Ihre Eltern sind nicht verwandt. Beide Söhne erhalten die gleichen elterlichen Allele, eine Kosegregation der Erkrankung mit dem *SLC12A3*-Lokus ist also formal möglich. In der weiteren Mutationsanalyse des *SLC12A3*-Gens bleiben die Geschwister aber unauffällig.



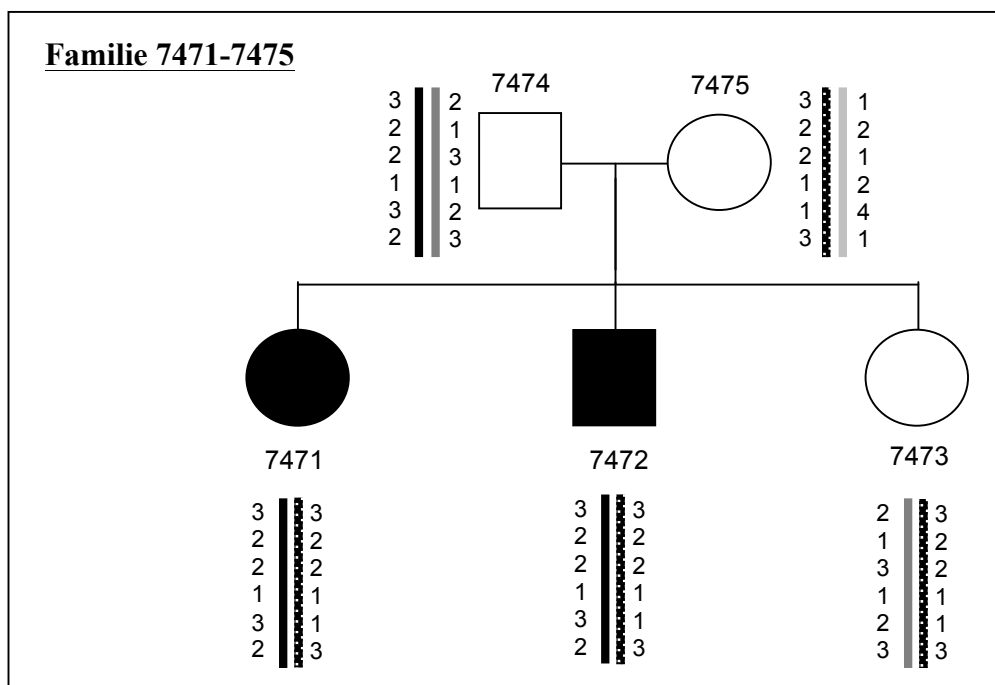
Familie 7294-7295 – Die türkischen Eltern haben 2 Töchter mit typischem GS. Zur Untersuchung lag lediglich DNA-Material der beiden Töchter vor. Beide Töchter erben über weite Strecken des 16q13-Lokus die gleichen Haplotypen. Sie sind langstreckig homozygot, was Konsanguinität der Eltern auch vor deren ethnischen Hintergrund nahelegt. Tochter 7293 ist über den gesamten Markerbereich homozygot, während ihre Schwester als Folge einer Rekombination (*crossing over* in der Meiose) distal des Markers D16S494 heterozygote Allele trägt. Die das *SLC12A3*-Gen am engsten eingrenzenden Mikrosatelliten liegen noch diesseits der Rekombination, daher ist die Haplotypenkonstellation weiterhin vereinbar mit einer Kosegregation der Erkrankung mit dem *SLC12A3*-Gen. Die nachfolgende Mutationsanalyse blieb aber unauffällig.

Familie 7293-7294

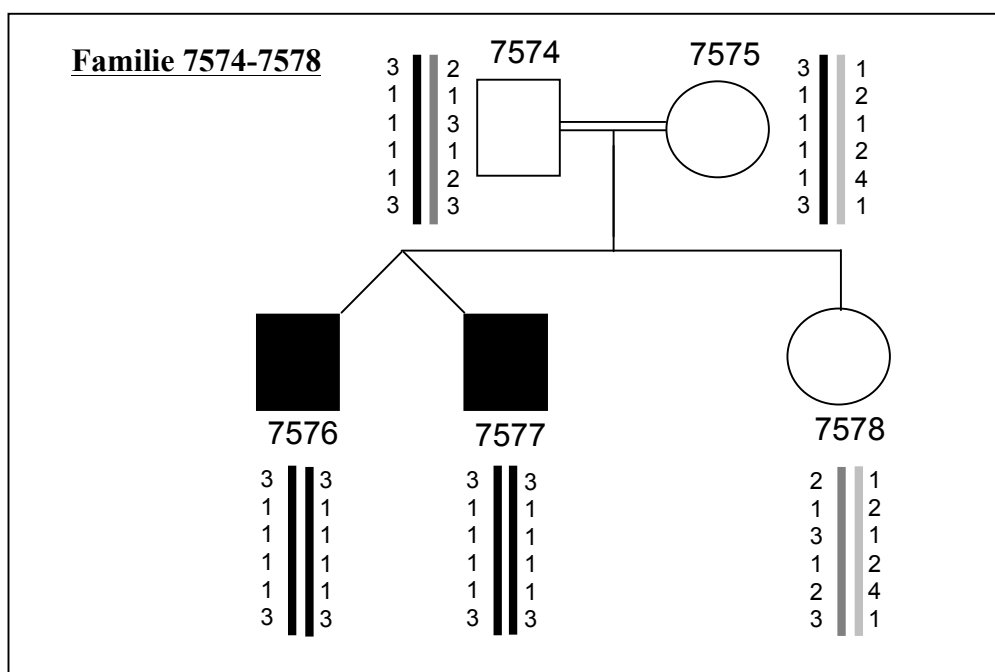
Familie 7620-7623 – An der Spitze dieser türkischen Familie steht ein konsanguines Elternpaar. Beide Eltern besitzen je ein identisches Allel auf 16q13, passend zu ihrer Blutsverwandtschaft. Von den beiden Söhnen ist einer am GS erkrankt. Der erkrankte Sohn erbt von beiden Elternteilen das identische Allel, er zeigt Homozygotie auf allen getesteten Mikrosatelliten. Der gesunde Sohn erbt die jeweils anderen elterlichen Allele. Zusätzlich rekombiniert er distal des Markers D16S494 auf dem väterlichen Chromosom 16. Bei dem Patienten wurde eine homozygote *SLC12A3*-Mutation nachgewiesen. (siehe Kap. 3.1.4)

Familie 7620-7623

Familie 7471-7475 – Die aus der Schweiz stammende Familie besteht aus einem nicht-konsanguinen Elternpaar mit 3 Kindern. Zwei Kinder haben das Gitelman-Syndrom. Beide Patienten sind auf 16q13 haplotypisch identisch, die gesunde Schwester hingegen hat ein anderes väterliches Allel geerbt. Bei den erkrankten Geschwistern wurde später eine heterozygote *SLC12A3*-Mutation nachgewiesen (siehe Kap.3.1.4).

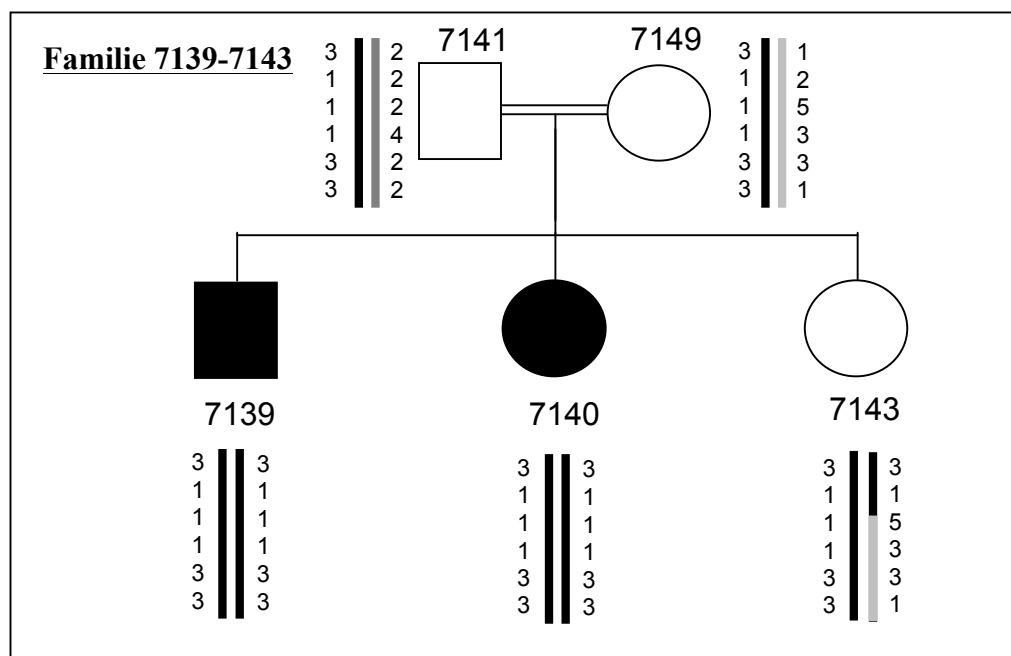


Familie 7574-7578 – Die israelischstämmige Familie besteht aus anamnestisch nicht-konsanguinen Eltern, einem klinisch betroffenen dizygoten Zwillingspaar und einer gesunden älteren Schwester. Die Zwillinge erben die gleichen elterlichen Allele auf 16q13 und zeigen darüber hinaus Homozygotie in allen getesteten Mikrosatelliten. Der Nachweis eines identischen Allels in beiden Eltern ist wieder Hinweis auf Konsanguinität der Eltern. Die gesunde Schwester erbt jeweils das andere elterliche Allel. Die Mutationsanalyse deckte bei den Zwillingen gleich zwei homozygote *SLC12A3*-Mutationen auf (siehe Kap.3.1.4). Interessant ist hier die seltene unterschiedliche phänotypische Expression bei vermeintlich identischem Genotyp der Zwillinge.



Familie 7139-7149 – Die Eltern dieser türkischen Familie sind Cousin und Cousine. Zwei ihrer drei Kinder sind am Gitelman-Syndrom erkrankt. Die Haplotypen-Analyse bestätigt die Konsanguinität der Eltern, da sie je ein identisches Allel besitzen. Dieses Allel ist auch von beiden Eltern an die erkrankten Kinder weitergegeben worden, beide Kinder verhalten sich homozygot im Chromosomenabschnitt 16q13. Die spätere Mutationsanalyse zeigte eine homozygote *SLC12A3*- Mutation (siehe Kap.3.1.4).

Die gesunde Schwester erhält von dem Vater das „kranke“ Allel, vor der Erkrankung bewahrt hat sie aber eine Rekombination auf dem mütterlichen Allel proximal des Markers D16S3140. Rekombinationen dieser Art ebenso wie bei 7294 und 7623, eng lokalisiert am Kandidatengen, waren bei der ursprünglichen Suche nach dem verantwortlichen Genort für das Gitelman-Syndrom sehr hilfreich.



In allen acht informativen Familien kosegregiert die Erkrankung mit 16q13 und damit dem *SLC12A3*-Genlocus. Dies ist gutes Indiz für die angemessene Selektion der Kohorte. In 3 Familien, die primär wegen ihres Multiplex-Charakters in die Untersuchungen einbezogen wurden, deckte die Haplotypen-Untersuchung zusätzlich Konsanguinität der Eltern auf, die zuvor anamnestisch negiert worden war. Zwei der Familien sind türkischer Herkunft, eine stammt aus Israel mit jüdischer Provenienz.

In vier der fünf eingeschlossenen türkischen Familien wurde Konsanguinität nachgewiesen, und auch die in den aktuellen Kopplungsanalysen unberücksichtigte türkische Patientin 7470

erwies sich in späteren Untersuchungen als Kind konsanguiner Eltern. Retrospektiv wären Ihre Haplotypen in der 16q13 Region nicht homozygot gewesen, und hätten da schon die Beteiligung mindestens eines weiteren Gens an der GS-Erkrankung nahegelegen können. Auf diese Patientin wird später noch eingegangen.

3.1.3 Ergebnisse der Mutationsanalyse

Das *SLC12A3*-Gen besteht aus 26 Exonen, die 3093 kodierende Nukleotide umfassen. Die gesamte kodierende Sequenz sowie die flankierenden Exon-Intron-Übergänge wurden auf Basenveränderungen untersucht. Bereits im Vorfeld waren bei allen eingeschlossenen Patienten Mutationen im *CLCNKB*-Gen (basolateraler Chloridkanal im TAL und DCT) ausgeschlossen worden.

Bei 20 der 28 untersuchten Patienten konnte wenigstens eine Mutation im *SLC12A3*-Gen identifiziert werden. Unter den informativen Familien, deren Haplotypenverteilung mit Kosegregation der Erkrankung mit dem *SLC12A3*-Lokus vereinbar wäre, ließen sich bei 6 der 8 Familien tatsächlich auch *SLC12A3*-Mutationen verifizieren (5 homozygote und eine heterozygote Mutation).

Bei elf Patienten lag die Mutationen homozygot vor (Tab. 3-2), bei zwei weiteren konnten je eine (unterschiedliche) heterozygote Mutationen auf den elterlichen Allelen nachgewiesen werden, sog. compound Heterozygotie (Tab. 3-3). In der Bilanz sind damit 13 Patienten vollständig genetisch geklärt, das heißt zwei Drittel der *SLC12A3*-Mutationen tragenden Patienten. Ein Drittel der Patienten (7/20) trug nur eine heterozygote *SLC12A3*-Mutation (Tab. 3-4), sie sind genetisch nur unvollständig geklärt. Diese Ratio entspricht aber gut den aktuellen Angaben in der Literatur zur GS-Genetik [3]. Bei acht Patienten der Ausgangskohorte ließ sich überhaupt keine *SLC12A3* Mutation nachweisen, unter ihnen konnte die Patientin 7470 später einer anderen Krankheits-Entität zugeordnet werden (siehe Diskussion).

Insgesamt 13 verschiedene Mutationen wurden detektiert, fünf davon sind in der Literatur bisher nicht publiziert. Unter den Mutationen sind elf Basensubstitutionen, neun Punktmutationen führen zu einem Aminosäuren-Austausch in konservierten Anteilen des NCCT-Moleküls, die beiden anderen verändern *Donor splice sites* an Exon-Intron-Übergängen. Die übrigen zwei Mutationen sind Deletionen von einem Nukleotid mit

konsekutiver Verschiebung des Leserahmens (*frameshift* Mutation) und verfrühtem bzw. verspätetem Stopp der Proteinsynthese an einem neu generierten Stopp-Kodon.

Des Weiteren fiel bei der Mutationsanalyse eine Vielzahl an Polymorphismen auf. Hier handelte es sich überwiegend um Basensubstitutionen in Intron-Abschnitten oder Nukleotid-Veränderungen in kodierenden Abschnitten, die aber keine Änderung der Aminosäuren-Position oder an den Schnittstellen in Exon/Intron-Übergängen nach sich ziehen, sogenannte stille Mutation [49].

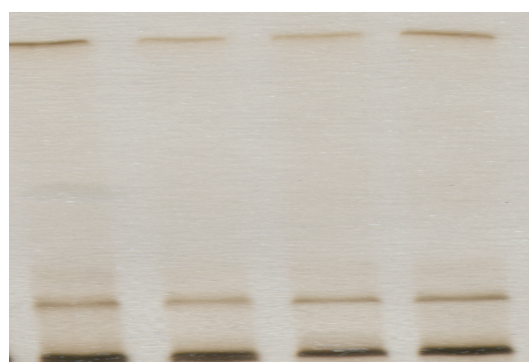
Patienten-Code	Zygotität	Lokalisation
homozygot (n=11)		Exon
7576, 7577	P643L	16
	R955Q	25
7606	R1009(2) Del G→fs→STOP(AS 1021+4)	26
7381	R655C	16
7139, 7140	W558R	14
7622	G463E	11
7221, 7222 7611, 7612	Donor splice site Intron9: Nucl 1208+1 G→T	9
compound heterozygot (n=2)		
7603	S178E	4
	G729V	18
7396	I 580 (2) DelG→fs→STOP (AS-Pos.610)	14
	Donor splice site Intron24: Nucl 2881+1 G→T	24
heterozygot (n=7)		
7542, 7549	Donor splice site Intron24: Nucl 2881+1 G→T	24
7471, 7472 7427, 7430	L850P	22
F 584	L272P	6

Tabelle 3-2: detektierte *SLC12A3*- Mutationen mit Zygotie-Status

Im Folgenden werden die Befunde der SSCP-Analyse und der Sequenzierung beschrieben und dargestellt:

7576, 7577 – Die Zwillinge erweisen sich als Träger von gleich 2 homozygoten Punktmutationen. Die SSCP-Analyse von Exon 16 zeigt eine sehr diskrete Doppelkontur der nicht denaturierten DNA-Fraktion, die sich in der Sequenzierung als homozygoter Basenaustausch von Cytosin zu Thymin an Nukleotid-Position (nucl)1953 herausstellt. Auf Proteinebene führt dies zu einem Wechsel von Prolin zu Leucin an Position 643 (P643L). In Exon 25 zeigt sich in der Elektrophorese ein auffälliger Shift des denaturierten DNA Fragments, der sich in der Sequenzierung auf einen Austausch von Guanin nach Adenin (nucl 2889) zurückführen lässt. Ihm folgt ein Wechsel von Arginin nach Glutamin (R955Q) auf Aminosäureebene.

Mutation - Exon 16 :

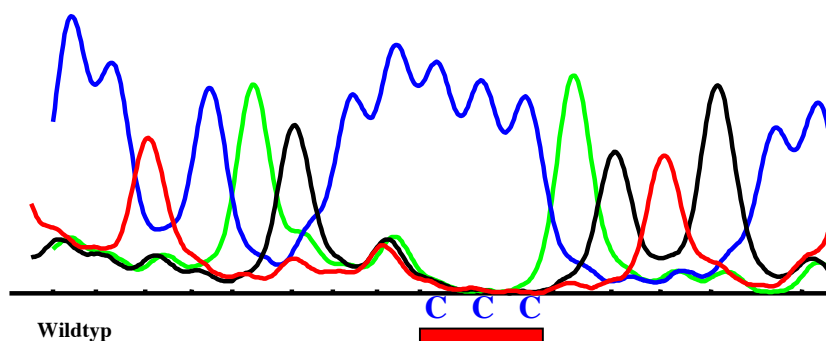


7576

7577

Kontrollen

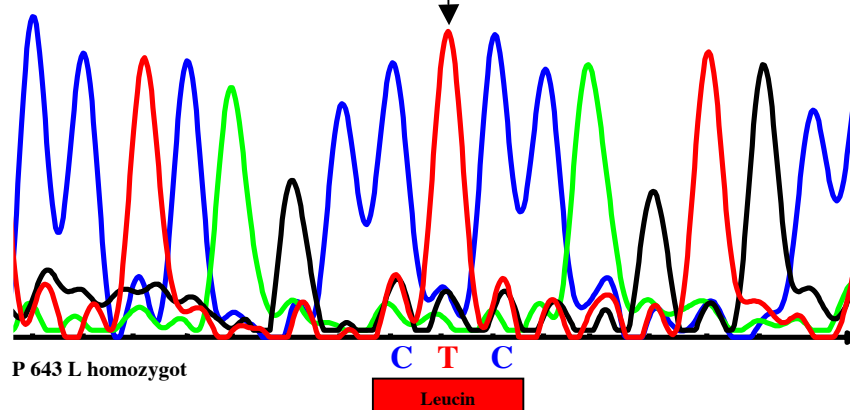
Kontrolle



Wildtyp

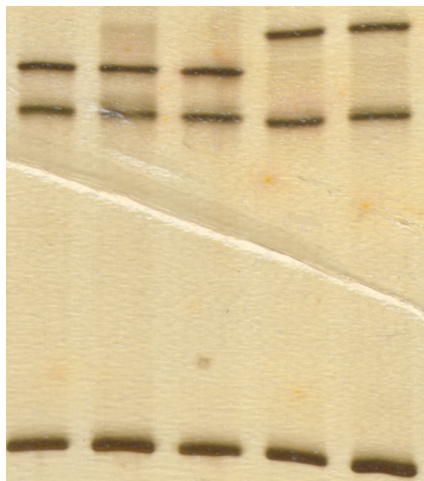
Prolin

Patient 7576 / 7577



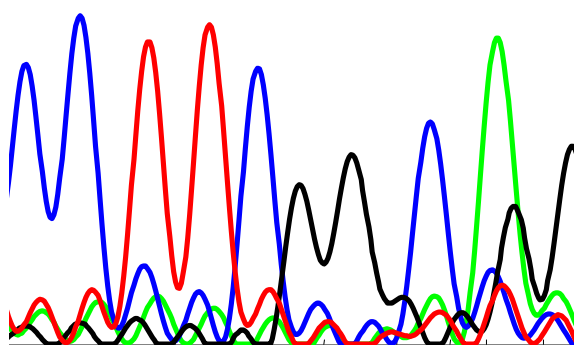
P 643 L homozygot

Leucin

Mutation - Exon 25:

7576 7577

Kontrolle

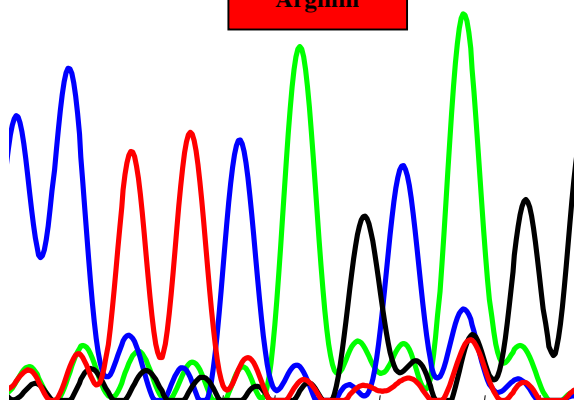


Wildtyp

C G G

Arginin

7576 / 7577



R 955 Q homozygot

C A G

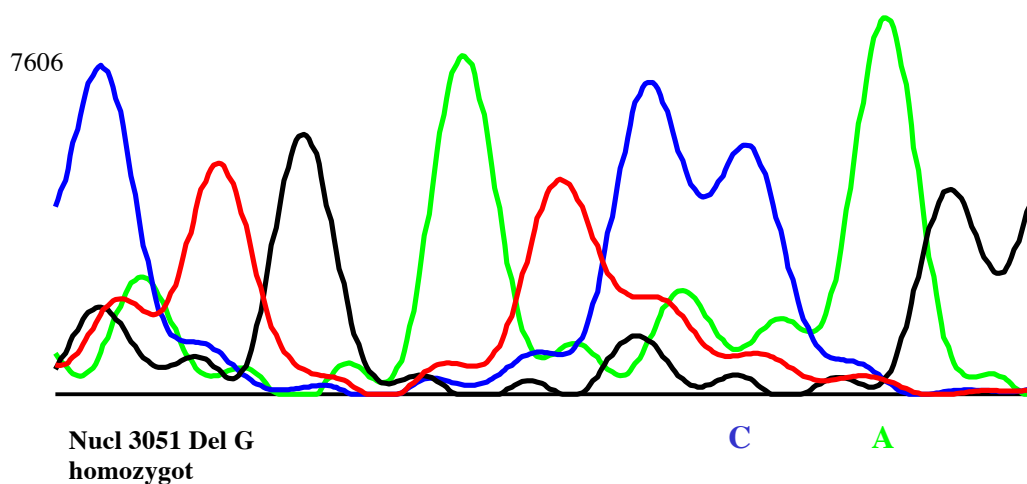
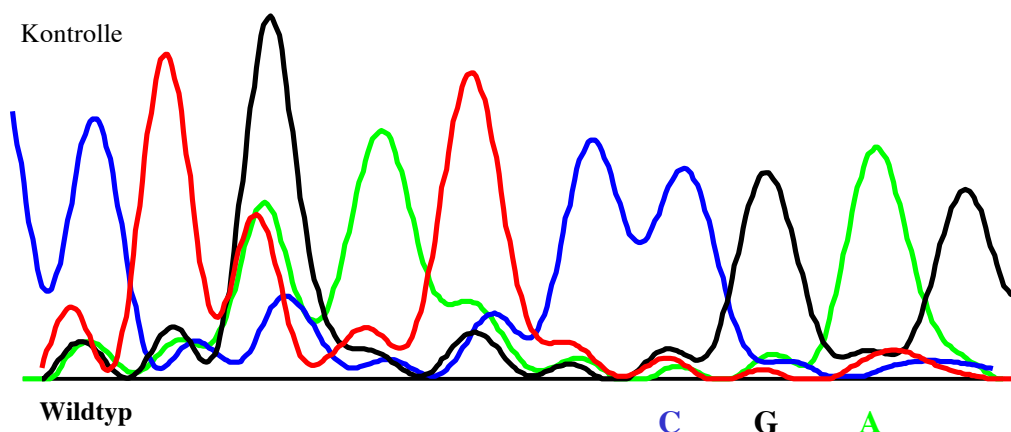
Glutamat

7606 – Die Patientin stammt von klinisch gesunden Eltern ab und hat zwei gesunde Geschwister. Sie erweist sich als Trägerin einer homozygoten Deletion der Guanin-Base an Nukleotid-Position 3051 in Exon 26. Diese *nonsense* Mutation generiert ein neues Stopp-Kodon, 4 Basentriplets in 3'-Richtung hinter dem natürlichen Stopp-Kodon.

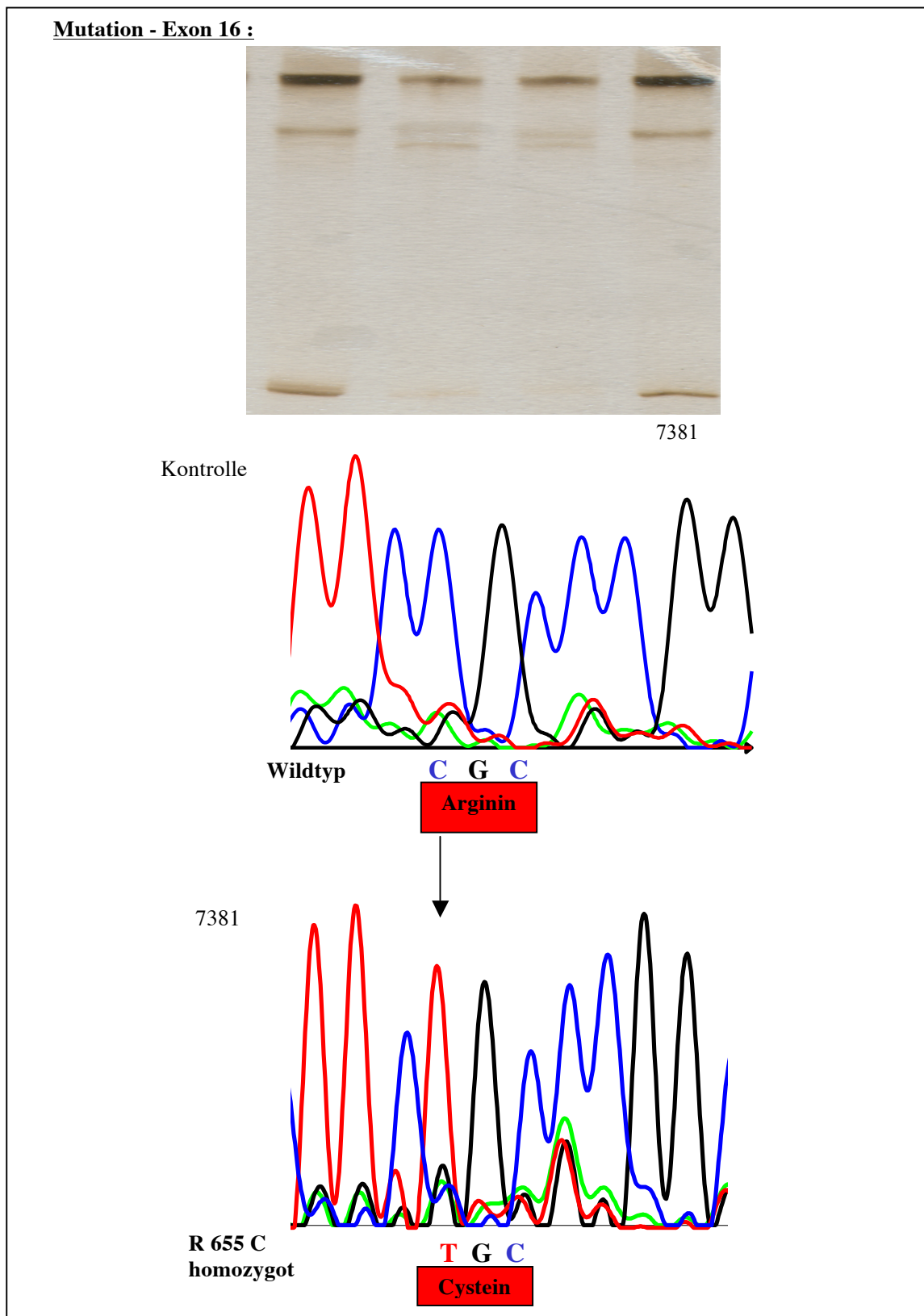
Mutation - Exon 26:



7606

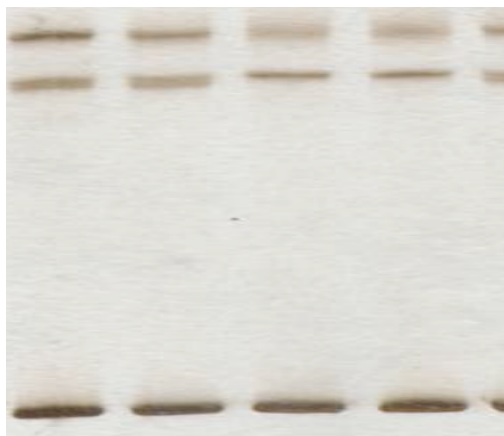


7381 - Der Patient mit unklarem Phänotyp ist Produkt einer konsanguinen Ehe, sein Bruder ist klinisch unauffällig. Der Patient trägt eine homozygote Missense-Mutation in Exon 16, der Basenaustausch von Cytosin zu Thymin (nucl 1988) bewirkt einen Aminosäureaustausch von Arginin nach Cystein an Position 655 des Kotransporter-Proteins.



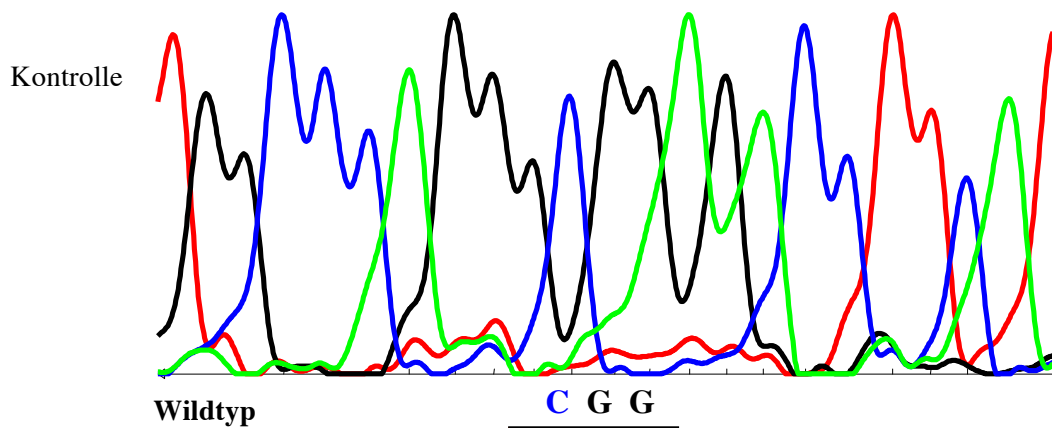
7139,7140 - Die Sequenzierung beider Patienten zeigt einen homozygoten Basenaustausch von Thymin zu Cytosin (nucl 1697) im Exon 14, dem ein Wechsel von Tryptophan nach Arginin an der konservierten Aminosäure-Position 558 des NCCT-Moleküls folgt.

Mutation- Exon 14:



7139

7140

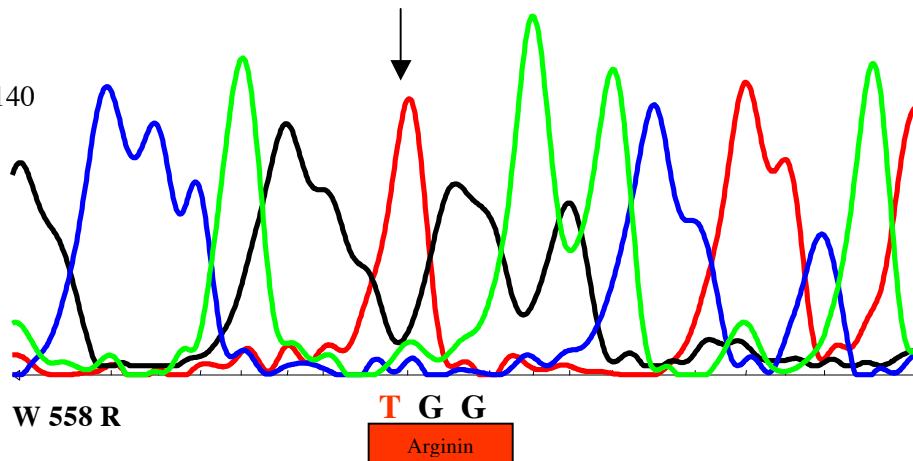


Wildtyp

C G G

Tryptophan

Patient 7139 /7140



W 558 R

T G G

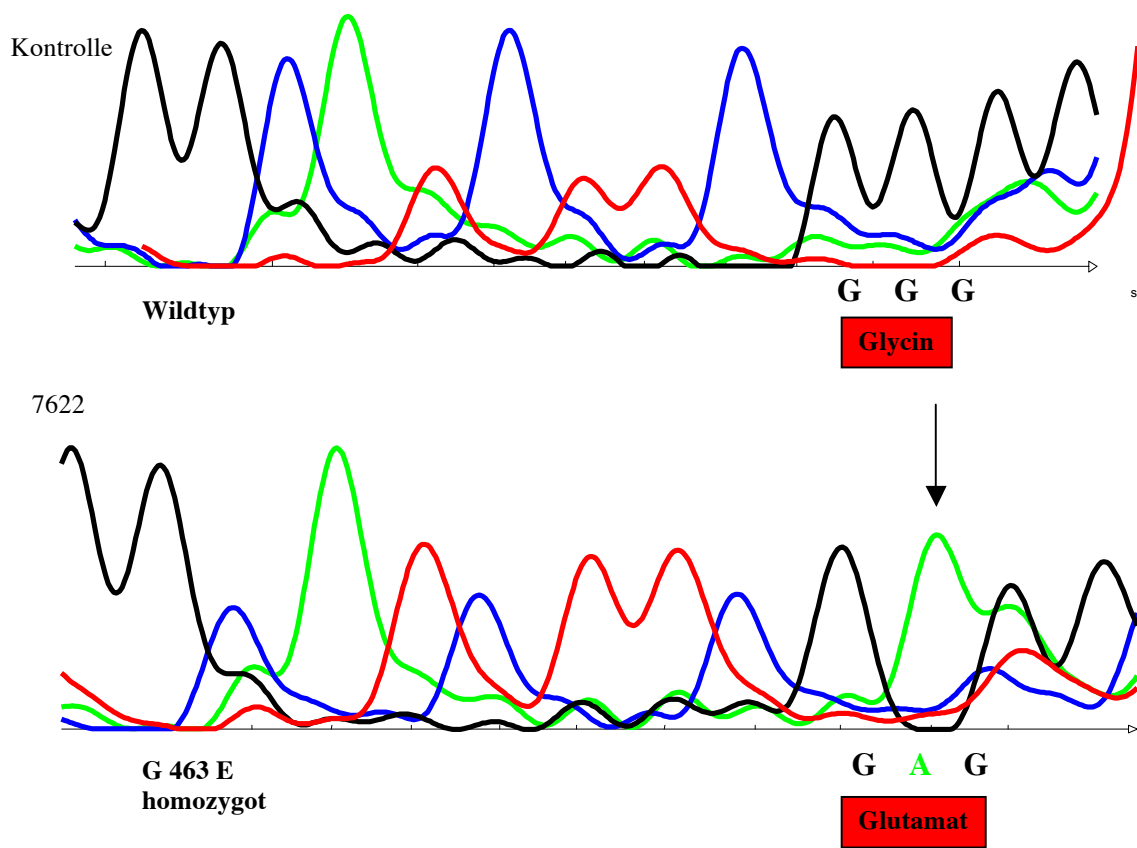
Arginin

7622 – Dieser GS Patient ist ein Sohn konsanguiner Eltern; in der Haplotypen-Analyse kosegregierte die Erkrankung mit dem *SLC12A3*-Lokus. Er trägt eine homozygote Punktmutation in Exon 11. Der Austausch von Guanin gegen Adenin (nucl 1413) führt auf Aminosäurenebene zu einem Wechsel von neutralem Glycin⁴⁶³ zu saurem Glutamat.

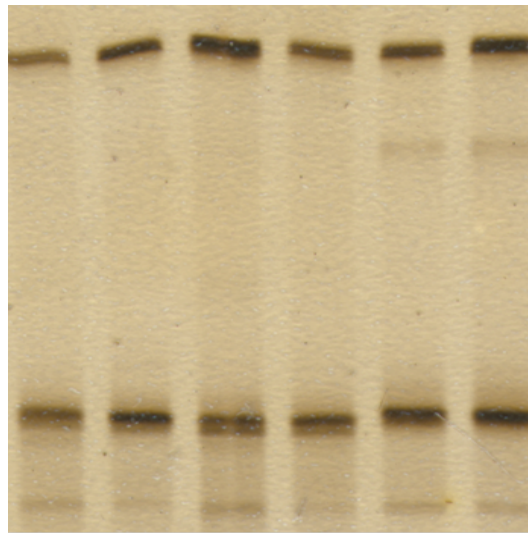
Mutation - Exon 11:



7622

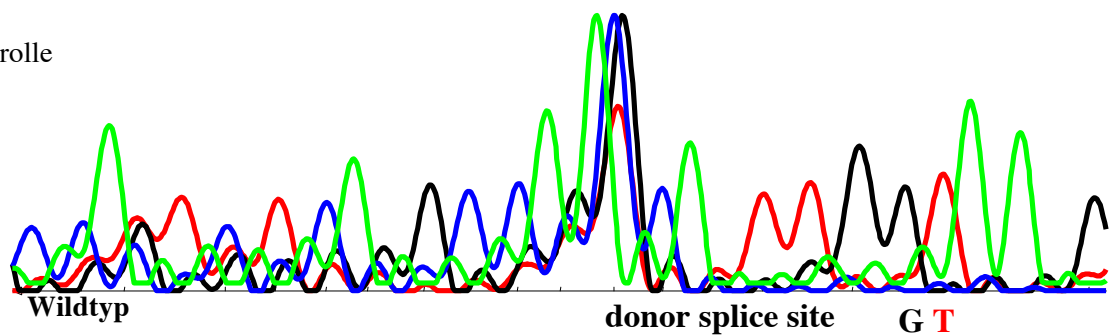


7221, 7222 – Diese Sinti-Familie war informativ wegen ihres Multiplex-Charakters; die Homozygotie der Allele auf 16q13 wies weiter auf Konsanguinität. Die Geschwister sowie zwei weitere Patienten (7611,7612) aus der Ethnie der Sinti sind Träger der homozygoten Donor splice site-Mutation an Intron 9 (nucl1208+1). Ein *founder*-Effekt ist wahrscheinlich.

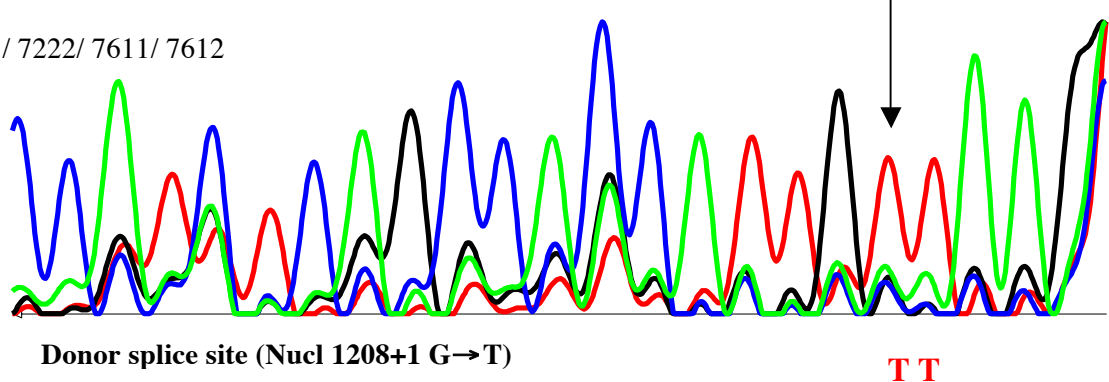
Mutation -Exon 9:

7611 7612 7221 7222

Kontrolle



7221/ 7222/ 7611/ 7612



7603 – Bei diesem Patienten wurden zwei heterozygote Mutationen nachgewiesen. Eine Punktmutation (Thymin statt Cytosin, nucl 558) in Exon 4 führt zum Austausch von Serin nach Glutamat an Position 178 des Transportproteins, ein weiterer Basentausch in Exon 18 (Guanin zu Thymin, nucl 2211) zum Wechsel von Glycin 729 zu Valin. Durch Nachweis

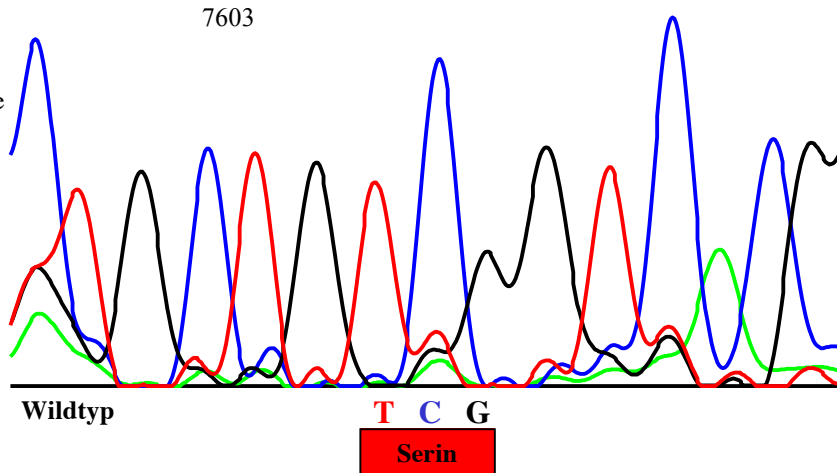
heterozygoter Mutationen auf je einem elterlichen Allel ist dieser Patient genetisch vollständig geklärt, er gilt als compound heterozygot.

Mutation - Exon 4:



7603

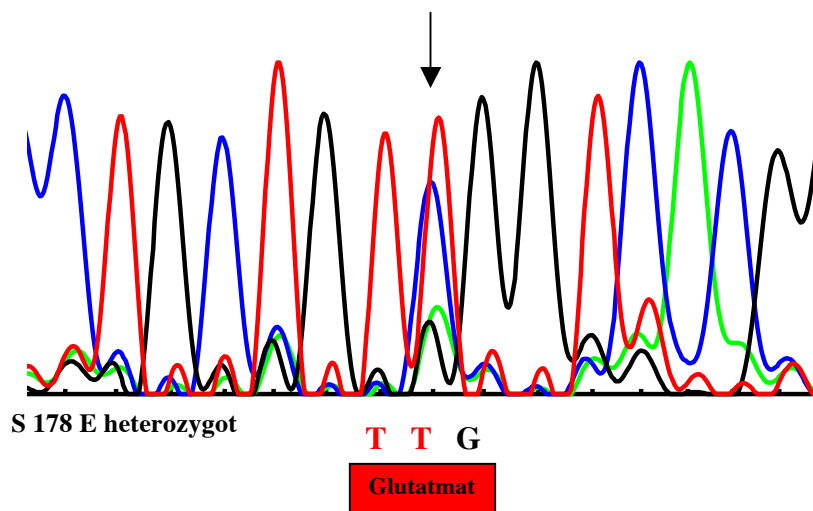
Kontrolle



Wildtyp

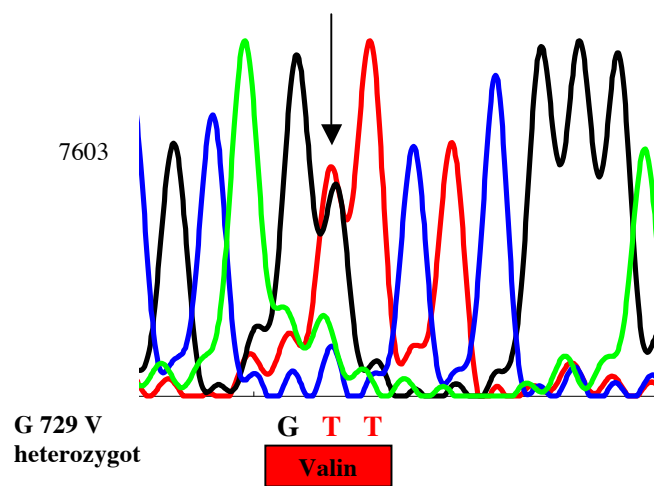
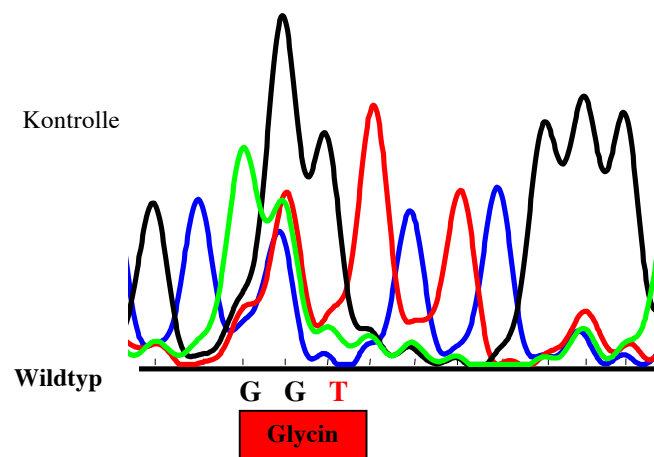
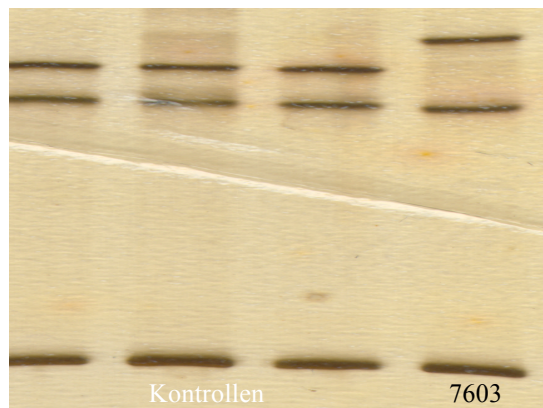
T C G
Serin

7603

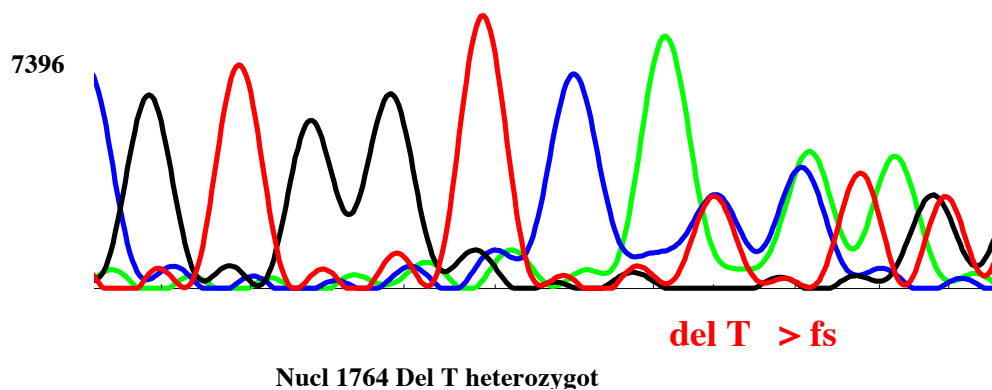


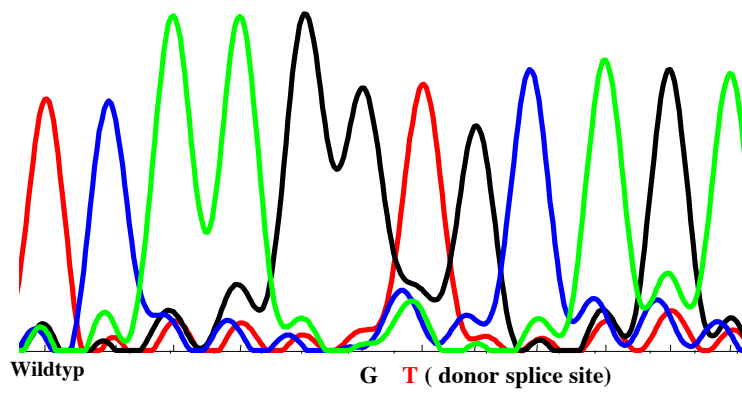
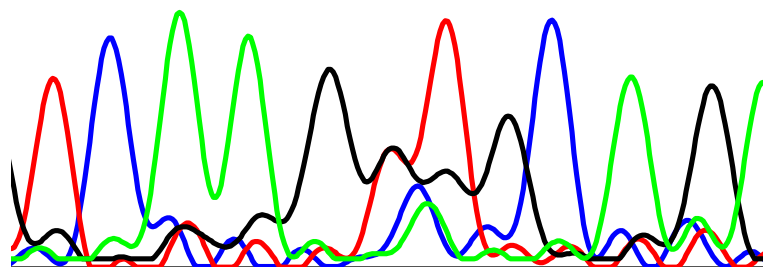
S 178 E heterozygot

T T G
Glutamat

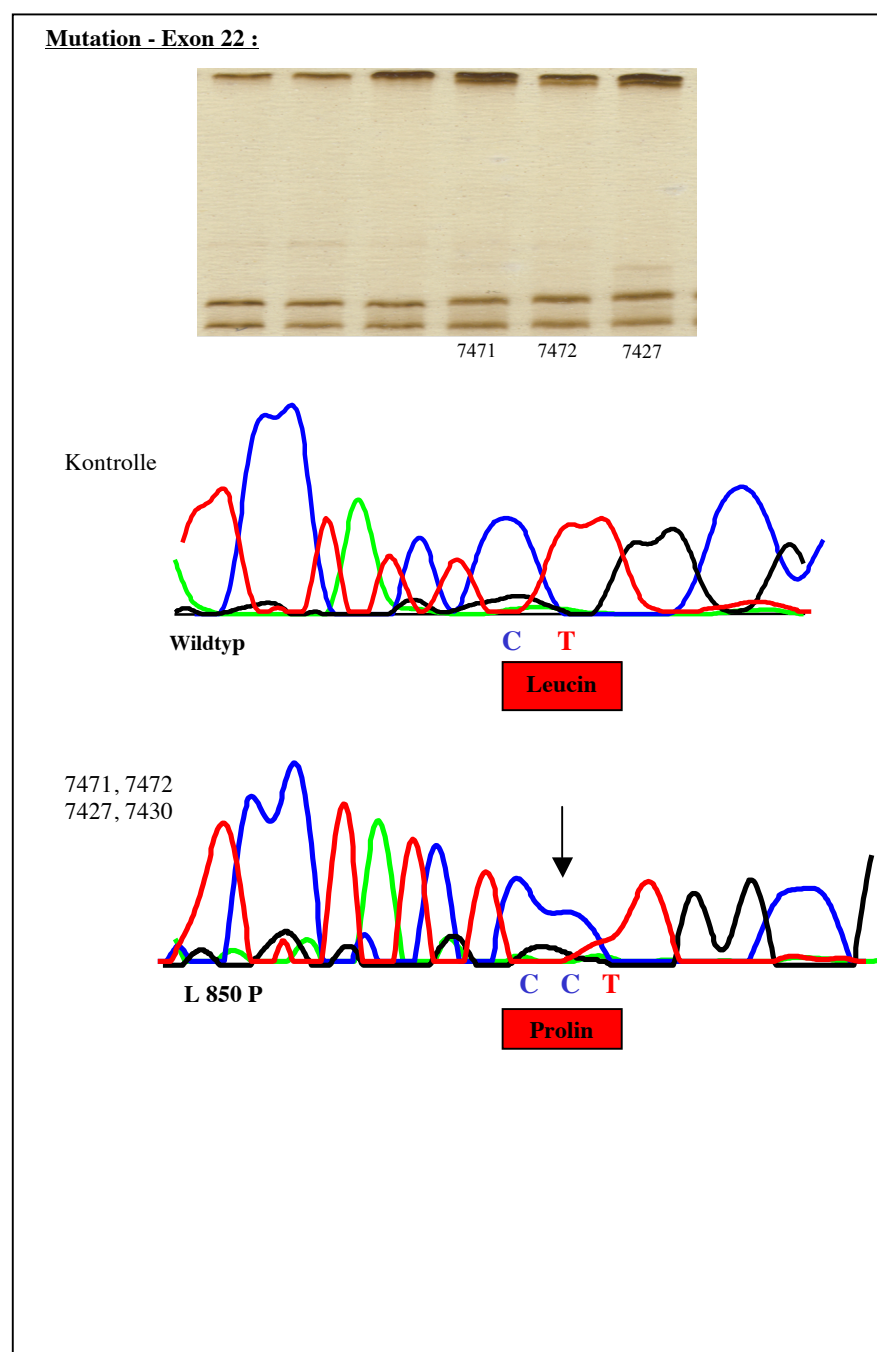
Mutation -Exon 18 :

7396

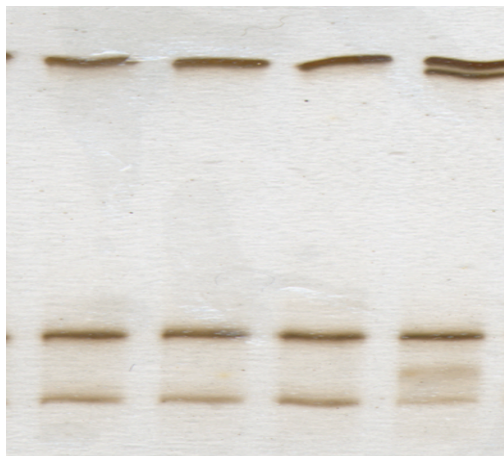


Mutation - Exon 24:**Kontrollen****7542****7549****7396****Wildtyp****G T (donor splice site)****Intron 24 Nucl 2881+1 G→T heterozygot****T T****7542/ 7549/ 7396**

7471, 7472 – Beide Patienten tragen auf einem elterlichen Allel einen Basenaustausch von Thymin zu Cytosin (nucl 2574), dem auf Proteinebene der Ersatz von Leucin850 zu Prolin folgt mit deletärer Wirkung. Auch bei der nicht betroffenen Schwester ließ sich die heterozygote Mutation nachweisen. Mit Kenntnis des Ergebnisses der Haplotypen-Untersuchung lässt sich folgern, dass diese Mutation auf dem an alle drei Kinder vererbten mütterlichen Allel liegt. Die notwendige zweite Mutation auf dem väterlichen Allel wurde bei den Patienten nicht detektiert. Die heterozygote L850P-Mutation wurde auch bei den Patienten **7427** und **7430** identifiziert. Herkunftsland der beiden Letzteren ist Spanien, das Geschwisterpaar stammt aus der Schweiz.

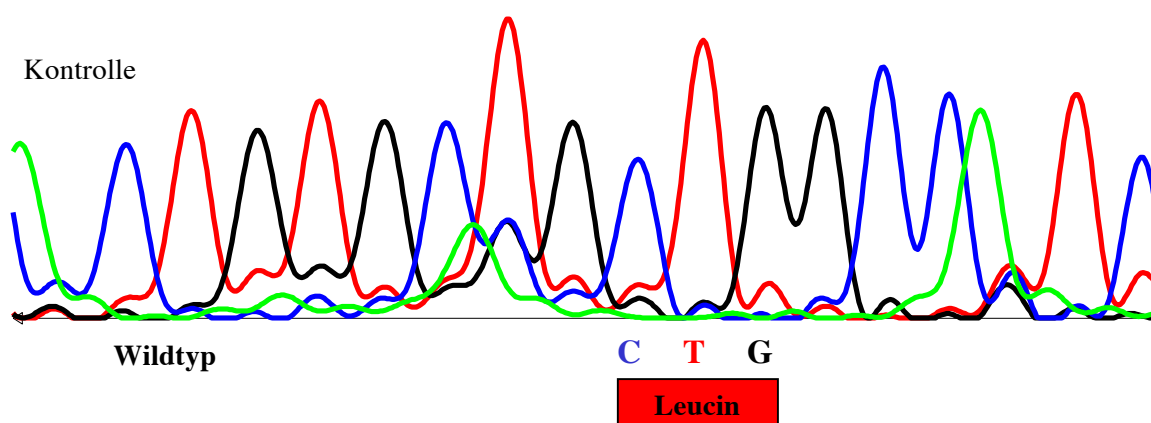


F 584– Auch bei der letzten Patientin konnte nur eine heterozygote Missense-Mutation gefunden werden. Es handelt sich hierbei um einen Aminosäurewechsel von Leucin zu Prolin in Position 272 des *SLC12A3*-Gens, hervorgehend aus der Punktmutation Cytosin statt Thymin in Exon 6.

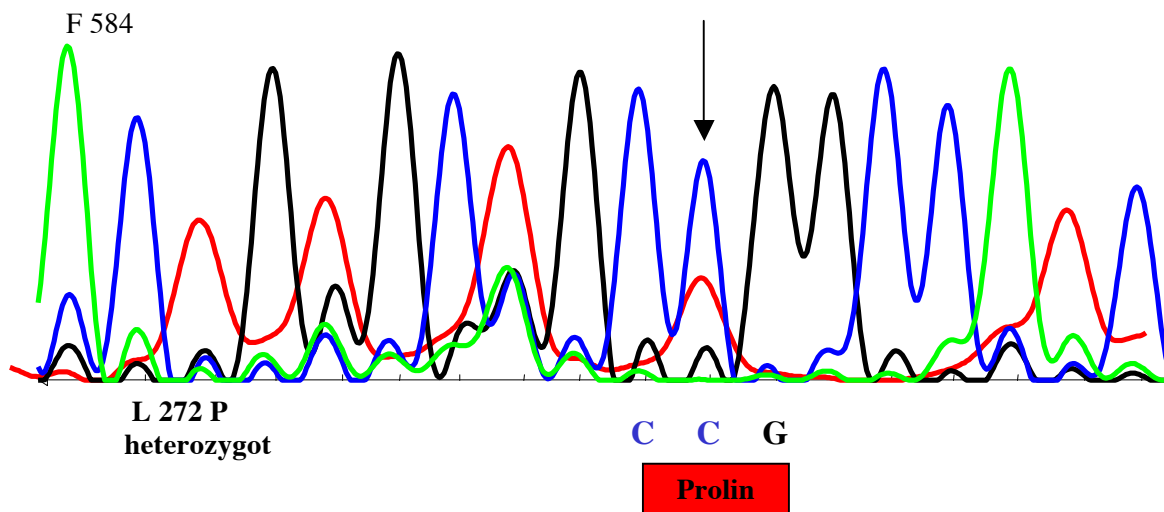
Mutation - Exon 6:

F584

Kontrolle



F 584



3.1.4 Phänotyp-Genotyp-Korrelation

	7221	7222	7610	7611	7612	7609	7622	7139	7140	7471	7472	7624	7242	7243	7396
Konsanguinität	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	+	+	+	-	-	Ø	-	-	-
Nationalität	G	G	G	G	G	G	T	T	T	CH	CH	D	B	B	D
Phänotyp	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS
Mutation <i>SLC12A3</i> -Gen	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/+

	7293	7294	7470	7576	7542	7577	7603	7606	7381	7430	7427	F584II	7549
Konsanguinität	+	+	Ø	+	-	+	Ø	Ø	+	-	-	Ø	Ø
Nationalität	T	T	T	I	D	I	D	I	T	S	S	D	D
Phänotyp	GS	GS	GS	GS	cBS	cBS	cBS	cBS	cBS/GS	cBS/GS	cBS/GS	cBS/GS	cBS/GS
Mutation <i>SLC12A3</i> -Gen	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-

Mutation *SLC12A3*-Gen -/- keine Mutation; Mutation *SLC12A3*-Gen +/- eine heterozygote Mutation; Mutation *SLC12A3*-Gen +/+ homozygote bzw. compound heterozygote Mutation, + Merkmal erfüllt; - Merkmal nicht erfüllt; Ø keine Angaben; CH Schweiz; I Israel; D Deutschland; B Belgien; T Türkei; G Gipsy; S Spanien

Tabelle 3-3 Gegenüberstellung der Phänotypen mit den *SLC12A3*-Genotypen

Oben gezeigt ist die Zuordnung der Phänotypen mit den *SLC12A3*-Genotypen. In einer konsanguinen Familie und einer Multiplex-Familie ließ sich trotz positiver Kosegregation der Erkrankung mit dem *SLC12A3* Locus keine Mutation nachweisen. Auch die Gruppe der Patienten aus der Sinti-Gemeinschaft erwies sich als genetisch heterogen, zwei Sinti-Familien vererben die gleiche Mutation, in zwei anderen gelang kein Mutationsnachweis.

In 11 von 19 Patienten mit für das Gitelman-Syndrom pathognomischer Trias aus hypokaliämischer Alkalose, Hypomagnesiämie und Hypokalziurie ließ sich mindestens eine Mutation im *SLC12A3*-Gen nachweisen; dies entspricht einer Detektionsrate knapp unter 60%. Es überrascht, dass alle vier Patienten mit klinischem Bild eines cBS ebenso wie die Patienten mit unklarem Phänotyp sich als Träger von *SLC12A3*-Mutationen herausstellten. Erinnert werden sollte aber daran, dass es sich hier um eine selektionierte Patienten-Kohorte mit bereits negativem Befund in der vorgezogenen Mutationsanalyse des *CLCNKB* Gens handelte (s. 3.1.3). Unangezweifelt bleibt *CLCNKB* das „erste“ Kandidatengen in der Ätiologie des cBS.

Riviera-Munoz et al. definierten Schweregrade der Gitelmann-Erkrankung nach dem Alter bei Erstmanifestation und Präsenz und Ausprägung einer Wachstumsstörung [72,73]. Wird solche Stratifizierung der Kohorte getroffen, fallen fünf von 28 Patienten in die Kategorie schwere Erkrankungsform (siehe Tabelle 3-4). Patient 7470 leidet zusätzlich an einer neurologischen

Erkrankung, die zerebrale Krampfanfällen und Ataxie einschließt. Weitere als schwer eingestufte Symptome wie Chondrokalzinose und Herzrhythmusstörungen traten im vorliegenden Kollektiv (noch) nicht auf. Zu berücksichtigen ist, dass es sich überwiegend um ein pädiatrisches Patientengut handelt, die Chondrokalzinose aber als typisches Spätereignis gilt [3].

Tabelle 3-4: Patienten mit schwerem Phänotyp nach Riviera-Munoz [72,73]

Patient	Geschlecht	Alter bei Manifestation	Wachstumsretardierung	Phänotyp	<i>SLC12A3</i> -Mutation
7542	w	3 Jahre	+	cBS	Donor splice site intron 24 (heterozygot)
7606	w	1,5 Jahre	+	cBS	Frameshift-Mutation (homozygot)
7576	m	2,5 Jahre	+	cBS	P643L, R955Q (homozygot)
7470	w	5 Jahre	+	GS	keine
7610	m	1 Monat	+	GS	keine

Aus der kleinen Fallzahl mit schwerem Phänotyp lässt sich die von *Riviera-Munoz* postulierte Geschlechterwendigkeit nicht verifizieren. Seiner Beobachtung nach exprimierten Jungen einen schwereren Phänotyp.

Bei drei der fünf Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf war mindestens eine *SLC12A3*-Mutation nachweisbar. Keine Mutation glich der anderen. Die Patienten 7542 und 7606 tragen *Nonsense*-Mutationen, Patient 7576 sticht durch gleich zwei homozygote Punktmutationen heraus. Die übrigen in der Kohorte nachgewiesenen *Nonsense*-Mutationen korrespondieren nicht mit einem auffällig schweren Krankheitsverlauf (n=6). Ein kausaler Zusammenhang zwischen Genotyp und Erkrankungsschwere lässt sich weiterhin nicht belegen, da der Zwillingsbruder von 7576, der die identischen *SLC12A3*-Mutationen trägt, sich mit milden GS-Phänotyp präsentierte.

4 Diskussion

4.1 Phänotyp-Analyse

Das klinische Bild der in diese Mutationsanalyse eingeschlossenen Patientenkollektive war bewusst variabler gewählt, als es nach bisheriger Kenntnis den *SLC12A3*-Mutationen zugeschrieben wird [17,85]. Die Nullhypothese war, *SLC12A3*-Mutationen führen zu hereditärem renalen Salzverlust mit pathognomonischen Trias Hypokaliämie, Hypomagnesiämie und Hypokalziurie, dem Gitelman-Syndrom. Nur 19 der untersuchten 28 Patienten erfüllten dieses Merkmal, ein Drittel der Kollektive präsentierte sich entweder normokalziurisch oder mit (weitgehend) normaler Magnesium-Homöostase. Einschränkend muss eingeräumt werden, dass bei 5 von 9 Patienten dieser Gruppe die Daten nur unvollständig zu erheben waren.

Das Alter bei der Erstmanifestation lag im Median bei 6,5 Jahren. Dies ist beinahe deckungsgleich mit den Angaben von Bettinelli et al., der ein Durchschnittsalter bei Diagnose von 6 Jahren beobachtete, in *Simons* Kollektiv lag es noch leicht höher bei 8 Jahren [7,85]. Ein diesbezüglicher *bias* bei der Auswahl der Patienten ist gegeben, da die Patienten überwiegend aus kindernephrologischen Ambulanzen rekrutiert wurden. 9 von 13 GS-Patienten mit Altersangabe bei Erstmanifestation präsentierten sich vor oder mit Erreichen des 10. Lebensjahres. Trotz des *bias* bringt die aktuelle Untersuchung aber die Gewissheit, dass es sich beim Gitelman-Syndrom nicht, wie früher angenommen, allein um eine Erkrankung des Erwachsenenalters handelt.

Entsprechend den Einschlusskriterien waren alle Patienten hypokaliämisch. Das Serum-Kalium über das gesamte Kollektiv hinweg lag im Median bei 2,7 mmol/l ($\pm 0,38$). Dieser Wert deckt sich exakt mit der von *Peters et al.* und *Herrero-Morin et al.* beschriebenen Größe in zwei GS-Kollektiven mit *SLC12A3*-Mutationen. ($n=13$, Kalium-Median=2,7 \pm 0,4 mmol/l; $n=34$, Kalium-Median 2,76 \pm 0,46 mmol/l) [33,63].

Neben der erhöhten luminalen Na-load im Sammelrohr ist eine RAAS-Aktivierung, die sich mit einer Ausnahme bei allen Patienten nachweisen ließ, führende Ursache der Hypokaliämie und der metabolischen Alkalose. Bei der Beurteilung des Aldosterons ist zu berücksichtigen, dass bei koinzidenter Hypokaliämie auch ein vermeintlich normaler Aldosteron-Wert bereits als inadäquat hoch zu bewerten ist.

Wie von der Konzeption der Untersuchung beabsichtigt, streuten die Werte von Serum-Magnesium und renaler Kalzium-Ausscheidung in einem breiten Spektrum und schlossen Normalwerte ein.

Die klinische Symptomatik variierte von Gedeihstörungen über unspezifische Symptome wie muskuläre Schwäche bis hin zu den charakteristischen Zeichen wie Tetanien und carpopedalen Spasmen. Häufiger wurde die Diagnose nicht durch ein klinisches Symptom gestellt, sondern durch pathologische Serum-Elektrolyte, die als Routine genommen wurden oder über einen interkurrenten Infekt hinaus persistierten. Retrospektiv schilderte die Mehrheit der Patienten (19/28) gesteigerten Salz hunger, so dass dieses Merkmal höchst sensitiv bei der Aufdeckung der HSLT ist.

Schwere Symptome, wie in der Literatur beschrieben (*Torsade-de-pointes*-Tachykardien als Folge einer QTc-Zeit-Verlängerung, schwere neurologische Ausfälle, symptomatische Chondrokalzinose) wurden in dem noch jungen Kollektiv bisher nicht manifest [37,80,88]. Singuläre Beobachtung blieb lediglich ein Symptomkomplex aus Epilepsie, Ataxie und Schwerhörigkeit bei Patient 7470.

Auffallend war die hohe Prävalenz von Kleinwuchs. Knapp ein Viertel der Patienten mit nachgewiesener *SLC12A3*-Mutation (5/20) zeigte ein Längenwachstum unter der 3. Perzentile. Bei zwei von ihnen wurde ein Wachstumshormon-Mangel gesichert. In der Literatur wurden bisher Wachstumsstörungen weniger dem GS, sondern mehr dem cBS zugeschrieben [86]. Jüngere Daten zur Prävalenz von Kleinwuchs bei GS-Patienten sind widersprüchlich und variieren mit großer Spannbreite von 8 bis 60 Prozent [7,29,33]. Aussagekräftige Langzeituntersuchungen zum Wachstumsverlauf bei GS-Patienten fehlen. *Herrero-Morin* et al. beschreibt, dass gute Therapieadhärenz (Elektrolytsubstitution) mit besserem Wachstum korreliert [33]. Auch wenn die Fallzahl unserer Arbeit (n=28) gering ist, so liegt sie im Bereich der anderen Untersuchungen (n=16-34) [7,33,72]. Somit ist zumindest die Tendenz abzuleiten, daß Kleinwuchs bei GS-Patienten höher prävalent ist als bei der Normalbevölkerung. Dessen Ursache ist Gegenstand aktueller Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe. Bisher singuläre Beobachtung bleibt Bettinellis Beobachtung an zwei GS-Patienten mit Hypophysenhypoplasie (*empty sella*), Wachstumshormon-Mangel und partieller ADH-Sekretionsdefizienz, der daraus ein neues hereditäres renal-tubulo-hypophysäres Syndrom postulierte [5] .

4.2 Kopplungsanalyse

Sämtliche acht zu Beginn der Untersuchung bekannten informativen Familien wurden in die Kopplungsanalyse der Chromosomen-Region 16q13 aufgenommen. In allen acht Familien kosegregierte die Erkrankung mit dem *SLC12A3* Gen-Lokus. Trotz geringer Zahl ließ der Untersuchungsstand bis dahin den Schluss zu, dass neben *SLC12A3* und *CLCNKB* kein anderes Gen an der Ätiologie des GS und cBS beteiligt ist. Dies stimmt mit Simons und Liftons Interpretation ihrer Ergebnisse der Genotypisierung an einer großen Patientenkohorte überein [85,86]. Dennoch ließen sich nur in drei Vierteln der informativen Familien (und in beinahe gleicher Zahl in dem Gesamtkollektiv) Mutationen im *SLC12A3*-Gen nachweisen. Dies kann begründet sein durch die begrenzte Sensitivität des hier gewählten Untersuchungsverfahrens. Aus Zeit- und Kapazitätserwägungen wurden das *SLC12A3*-Gen nicht von Anfang bis Ende direkt sequenziert, sondern ein Screening mit der SSCP-Methode vorangestellt. Vorausgesetzt, dass in den beiden informativen Familien mit (falsch-negativem) Ergebnis die Mutationen methodenbedingt nicht detektiert wurden, hat das hier gewählte Vorgehen eine Sensitivität von 75%. Diese Größenordnung entspricht Literaturangaben zur SSCP-Methode als Screening-Instrument zur Mutationsanalyse [61]. Neben den drei anamnestisch konsanguinen Familien macht die Haplotypenkonstellation eine Blutsverwandschaft bei drei weiteren Familien wahrscheinlich. Insbesondere erwiesen sich die untersuchten türkischen Familien mit HSLT als konsanguin. Die Konsanguinität der Eltern von Patient 7470 wurde allerdings erst im Nachhinein transparent, so dass er nicht in die ursprünglichen Kopplungsanalysen einbezogen wurde. Dieser „besondere“ Patient wird sich später als Träger einer Genmutation erweisen, die gut 6 Jahre nach Abschluss der hier vorgelegten Untersuchungen als Ursache einer neuen Krankheitsentität zuerst beschrieben wird.

4.3 Mutationen im *SLC12A3*-Gen

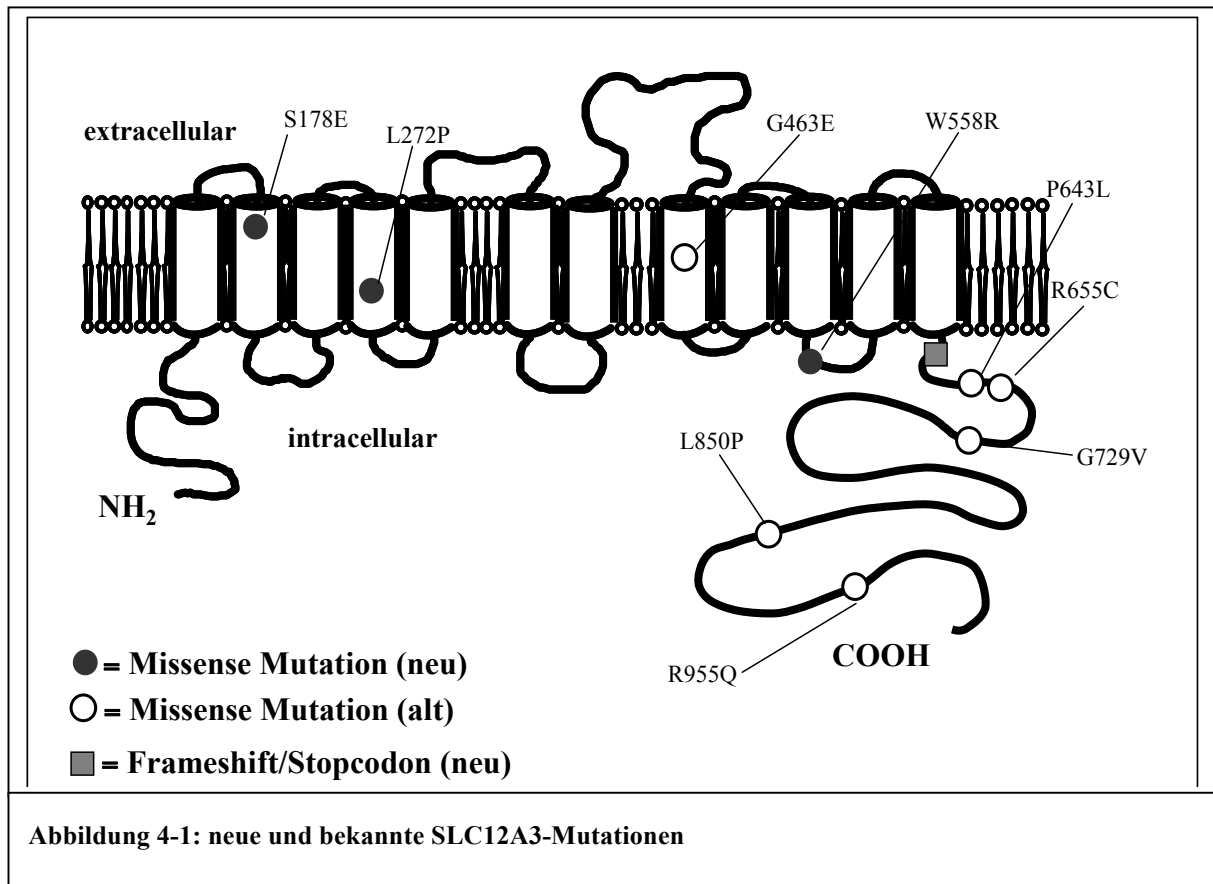
In der vorliegenden Arbeit wurden 28 Patienten aus 22 Familien über den gesamten kodierenden Bereich der 26 Exone des *SLC12A3*-Gens sowie der Intron-Exon-Übergänge auf Mutationen geprüft. Dreizehn verschiedene Mutationen konnten bei 20 Patienten detektiert werden. Acht Patienten oder knapp 30 Prozent der Kohorte blieben ohne Mutationsnachweis.

Keine der Mutationen ließen sich in 100 Kontrollallelen wiederfinden, so dass das Vorliegen eines Polymorphismus *per definitionem* ausgeschlossen war.

Elf Patienten waren für ihre Mutation homozygot, zwei Patienten waren compound heterozygot (verschiedene Mutationen auf den elterlichen Allelen). Lediglich ein mutiertes elterliches Allel wurde bei sieben Patienten gefunden. Die Tabelle 4-1 listet die nachgewiesenen Mutationen auf, wenn sie in der Literatur bereits mit Hinweis auf den Erstbeschreiber erwähnt sind. Abbildung 4.2 zeigt die Lokalisation der Mutationen im Strukturmodell.

Tabelle 4-1

Mutation	Erstbeschreibung
S178E	NEU
L272P	NEU
Donor splice site intron 9, nucl 1208+1 G→T	Coto [16]
G463E	Syren [90]
W558R	NEU
I580(2) Del T-fs-STOP (AS-Pos. 610)	NEU
P643L	Cruz[17]
R655C	Lemmink [46]
G729V	Cruz[17]
L850P	Simon[85]
R955Q	Simon [85]
Donor splice site intron 24 (nucl 2881+1 G→T)	Simon [85]
R1009(2) Del G- fs- STOP (AS-Pos. 1021+4)	NEU



Im Folgenden werden die Mutationen hinsichtlich ihres Konservierungsgrades in der Familie der elektroneutralen Kation-Chlorid-Kotransporter, ihrer Lage im Protein und der vermeintlichen Konsequenz für das Protein untersucht.

4.3.1 Mutation S 178 E:

Der Austausch von Cytosin durch Thymin an Nukleinsäureposition 558 in Exon 4 ist die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte, am weitesten N-terminal gelegene Mutation des *SLC12A3*-Gens. Sie führt zu einem Wechsel von Serin178 nach Glutamat. Die Mutation befindet sich in der 2. transmembranären Domäne des NCCT-Proteins (siehe Abb.4-2). Der Serinrest auf Position 178 ist in den Kotransportern NKCC1 und NCCT beim Menschen und verschiedenen anderen Spezies konserviert. Sowohl Serin als auch Glutamat sind hydrophil, Glutamat hat zusätzlich saure Eigenschaften.

Diese Mutation wurde noch nicht in der Literatur beschrieben. Cruz et al. [17] beschreiben an gleicher Stelle einen Aminosäureaustausch von Serin zu Leucin.

4.3.2 Mutation L 272 P:

Der Basentausch von Cytosin durch Thymin an Nukleinsäureposition 840 im *SLC12A3*-Gen zieht eine Aminosäureveränderung von Leucin272 zu Prolin nach sich. Im Kotransporterprotein findet sich die Mutation in der 4. transmembranösen Domäne wieder. Der Wildtyp Leucinrest an Position 272 ist in der Familie der elektroneutralen Kation-Chlorid-Kotransporter gut konserviert. Der neue Prolinrest ist bekannt für seine Eigenschaft, in α -Helices und β -Faltblattstrukturen für Unterbrechungen in diesen Strukturen zu sorgen. Die veränderte Tertiärstruktur des Proteins kann zu einer fehlerhaften Prozessierung im endoplasmatischen Retikulum führen. Auch bei diesem Aminosäure-Austausch handelt es sich um die Erstbeschreibung.

4.3.3 Mutation Donor splice site Intron 9 (nucl 1208+1, G→T):

Der Basenaustausch von Guanin zu Thymin an Nukleinsäureposition 1208+1 führt zur Auflösung der zu hundert Prozent konservierten 5'donor splice site in Intron 9. Diese Spleißstellen sind für die ordnungsgemäße mRNA-Prozessierung von essentieller Bedeutung. Eine funktionelle Expression einer anderen donor splice site-Mutation im *SLC12A3*-Gen zeigte bereits eine vorzeitige mRNA Degradation [72]. In der Literatur wird diese Mutation bei Patienten aus dem Kulturkreis der Sinti beschrieben; sie ist nach Entstehung über Generationen hinweg innerhalb von Sinti-Familien weitervererbt worden (sogenannter *founder effect*) [16,33]. In Übereinstimmung damit wurde diese Mutation in unserem Kollektiv auch lediglich bei Patienten der Sinti-Ethnie und nur in homozygotem Status gefunden. Allerdings gab es auch zwei GS-Familien aus der Sinti-Gemeinschaft, die keine solche Mutation aufwiesen.

4.3.4 Mutation G 463 E:

Diese Punktmutation in Exon 11 des *SLC12A3*-Gens bewirkt einen Austausch von Glycin durch Glutamat an Aminosäurestelle 463, aufgrund einer Sequenzveränderung von Guanin zu Adenin an Nukleinsäureposition 1413. Die Mutation befindet sich in der 8. transmembranären Domäne des Kotransporters. Der Glycinrest ist in den Natrium-Chlorid-Kotransportern der verschiedenen Spezies konserviert. Der Ersatz von Glycin durch die saure hydrophile Aminosäure Glutamat kann sich unter anderem durch das Fehlen von Flexibilität bei der

Proteinfaltung bemerkbar machen [49]. Diese Mutation ist durch Syren et al. bereits beschrieben [90]. Insgesamt sprechen alle erwähnten Aspekte für eine pathogene Mutation.

4.3.5 Mutation W 558 R:

Die Punktmutation von Cytosin zu Thymin an Nukleinsäureposition 1697 führt zu einem Einbau von Arginin statt Tryptophan⁵⁵⁸ in das NCCT-Protein. Diese Veränderung ist im NCCT-Protein im intrazellulären Verbindungsstück zwischen der 10. und der 11. transmembranären Domäne lokalisiert. Beim Tryptophan handelt es sich um eine hochkonservierte Aminosäure in der Familie der elektroneutralen Kation-Chlorid-Kotransporter. Der Aminosäurewechsel findet innerhalb hydrophiler Aminosäuren statt, mit dem Unterschied, dass es sich bei dem neu generierten Argininrest um eine Aminosäure mit basischen Eigenschaften handelt. Die Tatsache, dass die Mutation in einem hochkonservierten Bereich liegt, unterstützt seine mögliche pathogene Bedeutung. Auch diese Mutation findet ihre erste Erwähnung in dieser Arbeit.

4.3.6 Mutation I 580(2) Del T→fs→STOP (AS-Pos.610):

Die Deletion der einzelnen Thymin-Base an der 2.Stelle des für Isoleucin 580 kodierenden Triplets führt zu einer *frameshift*, d.h. zu einer Verschiebung des Leserahmens. Aber nicht allein die Translation einer jetzt unsinnigen Proteinsequenz distal der Mutation erklärt die deletäre Konsequenz dieser Mutation. 30 Aminosäuren weiter C-terminal wird ein vorzeitiges Stopp-Codon generiert. Das C-terminale Drittel des Kotransporter gelangt erst gar nicht zur Translation. Auch ohne funktionelle Analyse dieser bisher nicht beschriebenen Mutation ist ihre pathologische Relevanz leicht nachvollziehbar.

4.3.7 Mutation P 643 L:

Der Basenaustausch von Cytosin nach Thymin an Nukleinsäureposition 1953 in Exon 16 des *SLC12A3*-Gens führt zu einem Aminosäureeinbau von Leucin statt Prolin643 in das NCCT-Protein. Die Aminosäure Prolin ist an orthologen Positionen in der Familie der

NKCC2 hum	F	R	P	Q	C	I
NKCC2 mus	F	R	P	Q	C	I
NKCC2 rat	F	R	P	Q	C	I
NKCC1 hum	F	R	P	Q	C	L
NKCC1 mus	F	R	P	Q	C	L
NKCC1 rat	F	R	P	Q	C	L
NKCC1 squa	F	R	P	Q	C	L
NCCT hum	Y	R	P	Q	C	L
NCCT rat	Y	R	P	Q	C	L
NCCT oryct	Y	R	P	Q	C	L
KCC1 hum	W	R	P	Q	L	L
KCC1 mus	W	R	P	Q	L	L

elektroneutralen Kation-Chlorid-Kotransporter

hochkonserviert. Dies wird exemplarisch illustriert durch nebenstehendes Alignment von NCC-Proteinen anderer Spezies wie auch der Strukturverwandten Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter 1 und 2 (NKCC1 und 2) sowie des Kalium-Chlorid-Kotransporters (KCC1), menschlicher und anderer Spezies. Die Mutation befindet sich im C-Terminus des NCCT-Proteins, einer wichtigen Regulationsstelle für die Funktion des Kotransporters. Hier liegen unter anderem mehrere Phosphorylierungsstellen von Proteinkinasen [46]. Obwohl Prolin und Leucin beide hydrophobe Aminosäuren sind, hat Prolin als zyklische

Aminosäure einzigartige Eigenschaften wie Unterbrechungen von α -Helices bzw. β -Faltblattstrukturen [49].

Die Mutation ist 2001 durch Cruz et al. bereits beschrieben worden [17]. Insgesamt spricht vieles für eine kausalpathogene Bedeutung der P643L-Mutation.

4.3.8 Mutation R 655 C:

Der Austausch von Cytosin zu Thymin an Nukleotidposition 1988 bewirkt den Einbau von Cystein statt Arginin. Arginin ist an dieser Stelle innerhalb der Familie der elektroneutralen Kation-Chlorid-Kotransporter eine hochkonservierte Aminosäure. Die Mutation ist ebenfalls im intrazellulären C-Terminus des NCCT-Proteins gelegen. Auch hier handelt es sich um eine bereits bei GS-Patienten beschriebene Mutation [42].

4.3.9 Mutation G 729 V:

Eine weitere Punktmutation an Nukleinsäurestelle 2211 in Exon 18 des *SLC12A3*-Gens ist durch den Basenwechsel von Guanin zu Thymin charakterisiert. Dies führt konsekutiv zu

einem Austausch der Aminosäure Glycin 729 gegen Valin. Der Aminosäurerest Glycin ist in allen Proteinen in der Familie der elektroneutralen Kation-Chlorid-Kotransporter hochkonserviert und befindet sich im funktionell bedeutenden C-Terminus des NCCT-Proteins. Der Glycinrest erlaubt durch das Fehlen einer Seitenkette eine große Flexibilität in der Faltung des Proteins an dieser Stelle und wird bei der Mutation durch Valin ersetzt, einer Aminosäure mit apolarer Seitenkette. Die Mutation ist bereits durch Cruz et al. beschrieben [17]. Auch hier ist von einer pathogenen Mutation auszugehen.

4.3.10 Mutation L 850 P:

Der Basenaustausch von Thymin nach Cytosin (Nukleotid-Position 2574) bewirkt einen Einbau von Prolin statt Leucin an Position 850 des NCCT-Proteins. Die Mutation trifft erneut den für die Transportregulation wichtigen intrazellulären C-Terminus. Die Aminosäure Leucin ist von hohem Konservierungsgrad und findet sich an orthologer Stelle in allen anderen Mitgliedern der elektroneutralen Na-Cl Kotransporter. Der Ersatz der hydrophoben Aminosäure Leucin durch das ebenfalls apolare, zyklisch aufgebaute Prolin kann zu einer Veränderung der Proteinfaltung aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften führen. In der Literatur wurde diese Mutation bereits von mehreren Autoren beschrieben [46,85].

4.3.11 Mutation R 955 Q:

Der Basenaustausch von Guanin zu Adenin an Nukleinsäureposition 2889 führt zu einem Wechsel von Arginin955 nach Glutamin im C-Terminus des Kotransporters, und zwar in unmittelbarer Nähe einer Phosphorylierungsstelle von Proteinkinasen (Serin 953). Die Proteinphosphorylierung ist eine posttranslationale Möglichkeit der Proteinfunktion bzw. -regulation [46]. Der Argininrest ist in der Familie der elektroneutralen Kation-Chlorid-Kotransporter evolutionär hochkonserviert. Sowohl Arginin als auch Glutamin haben hydrophile Eigenschaften. Während Glutamin eine neutrale Aminosäure ist, verfügt Arginin über basische Eigenschaften [49]. Diese Mutation wurde bereits in der frühesten Publikation von Simon beschrieben [85].

4.3.12 Mutation Donor splice site intron 24 (nucl 2881+1 G→T):

Der Basenaustausch von Guanin (G) zu Thymin (T) an Nukleinsäurestelle 2881+1 führt zum Verlust der zu hundert Prozent konservierten 5'donor splice-site-Sequenz im Intron 24. Diese Sequenz ist Voraussetzung für den posttranskriptionale Spleißvorgang. Unter Spleißen versteht man die Entfernung von intronischer Sequenz aus dem mRNA-Strang unter Rekonnectierung der benachbarten Exonsequenzabschnitte. Der Verlust einer solchen Spleißstelle kann zwei verschiedene Folgen haben: Zum einen kann es zu einem Verlust kodierender Exonsequenz mit dem Resultat eines verkürzten mRNA-Moleküls kommen (das sogenannte *exon-skipping*). Zum anderen kann zusätzliche intronische Sequenz in die mRNA eingebaut werden, so dass ein größeres mRNA-Molekül entsteht (*cryptic splice site utilisation*). Die Folge für den Proteinaufbau ist zum einen ein Verlust von kodierender Information, zum anderen ein Zugewinn von afunktionaler Sequenz im synthetisierten Protein. Splice site-Mutationen sind nicht selten, gut 15 Prozent der bisher beschriebenen Punktmutationen liegen im Bereich der donor splice site [42]. Frühere Untersuchungen an splice site-Mutationen im *SLC12A3*-Gen wiesen veränderte Transskriptionsprodukte nach, die im endoplasmatische Retikulum vorzeitig degradiert wurden [72]. Die hier beschriebene Mutation wurde ebenfalls in Simons Originalpublikation 1996 beschrieben [85].

4.3.13 Mutation R 1009(2) Del G→fs→STOP (AS-Pos 1021+4):

Eine Deletion der Base Guanin an der 2. Position im für Arginin kodierenden Triplet (Aminosäureposition 1009) führt zu einer Verschiebung des Leserahmens. Auch hier wird in der Konsequenz ein neues Stoppkodon 11 Positionen weiter aufwärts generiert. Hier allerdings liegt das neue Stoppkodon jenseits originären Stopp-Codons. Das synthetisierte Protein hat C-terminal einen Unsinn-Peptid von 11 Aminosäuren Länge. Diese Mutation ist in der Literatur noch nicht beschrieben worden.

4.3.14 Zusammenfassende Beurteilung der Mutationsanalyse

Die molekulargenetische Analyse des *SLC12A3*-Gens in einer klinisch heterogeneren Patientenkohorte deckte bei 20 der 28 Patienten insgesamt 13 verschiedene Mutationen auf (71% Detektionsrate). Fünf Mutationen sind Erstbeschreibungen, die übrigen acht sind bereits in der Fachliteratur publiziert [16,17,46,85,90]. Die Mutationen liegen überwiegend an in der Evolution hoch konservierten Stellen im NCCT-Protein, so dass formal und a priori einiges für deren pathogentische Relevanz spricht. Noch höhere Sicherheit in der Beurteilung der deletären Konsequenz der Mutationen verspricht die funktionelle Charakterisierung in heterologen Expressionssystemen; das verbreitetste ist das *Xenopus*-Oozyten-Model. Erste funktionelle Expressionen von *SLC12A3*-Mutanten deckten Pathomechanismen auf, die bereits von anderen Membranproteinen gut untersucht sind, am ausführlichsten gezeigt an dem mit Mukoviszidose assoziierten Chlorid-Kanal. So passierten einige NCCT-Mutanten nicht die Qualitätskontrolle des endoplasmatischen Retikulums und gerieten frühzeitig in den Prozess der intrazellulären Degradation [43]. Kürzlich gelang Riviera-Munoz der Nachweis, dass einzelne *SLC12A3*-Mutanten auch die Plasmamembran erreichen, dort aber nur einen Bruchteil der normalen intrinsischen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp entwickeln [72]. Dieser Nachweis fehlt noch für die in dieser Arbeit beschriebenen Mutationen, lediglich für eine donor splice site-Mutation wurde eine frühzeitige intrazelluläre Degradation beschrieben [73].

Elf Patienten aus sieben Familien erwiesen sich als Träger einer homozygoten Mutation, das entspricht knapp 40 Prozent des Kollektivs. Normalerweise dominieren beim GS bedingt durch die relativ hohe Heterozygotenfrequenz (ein Prozent in der Normalbevölkerung) die compound heterozygoten Mutationen [37,72]. Grund für den hohen Anteil homozygoter Träger in unserem Kollektiv ist der Einschluss überdurchschnittlich vieler konsanguiner Familien, bei mancher wurde die Konsanguinität auch erst im Laufe der Untersuchungen transparent.

Die sechs betroffenen Sinti-Angehörigen wiesen in der Mehrheit die splice site-Mutation im Intron 9 auf. Deren hohe Prävalenz basiert auf einem *founder effect*, der auch schon Eingang in die Literatur gefunden hat [16,33]. Diese Beobachtung hat Relevanz bei der Planung von Mutationsanalysen von Erkrankten aus dem Sinti-Kulturkreis. Ethnogeschichtlich ebenso interessant und hier neu aufgedeckt ist, dass mindestens eine zweite Mutation unter den Sinti-Familien kursiert, die einen vergleichbaren Phänotyp verursacht.

Die verbleibenden sechs heterozygoten Mutationen verteilen sich auf neun Patienten aus acht Familien. Unter den Patienten, die den GS-Phänotyp erfüllten, wurde in gut einem Drittel lediglich ein mutiertes Allel nachgewiesen. Diese auf den ersten Blick ernüchternde Quote liegt aber noch unter den in vergleichbaren Arbeiten genannten Zahlen von rund 40 Prozent und weist auf die Komplexität dieses Gens und seiner molekularen Analyse hin [46,72]. Keinesfalls besteht Zweifel an der autosomal-rezessiven Transmission des GS, auch eine digene Erkrankung soll nicht in erster Linie erwogen werden, sondern hier wie in früheren Arbeiten ist das zweite mutierte Allel schlichtweg nicht detektiert worden [20,72]. Dies mag im Falle der vorliegenden Arbeit zum einen an der limitierten Sensitivität der SSCP-Screening-Methode liegen, zum anderen wurden regulierende Genabschnitte wie Promotor, Enhancerregion sowie tiefere intronische Sequenzen nicht untersucht. Eine japanische Arbeitsgruppe hat jüngst eine tiefe intronische Mutation über RNA-Analyse detektiert und als Ursache für das Scheitern der Detektion einer zweiten Mutation mit der herkömmlichen DNA-Sequenzierung der *SLC12A3*-Exonabschnitte ausgemacht [58]. Auch würden große heterozygote Gendeletionen weder durch SSCP noch durch die direkte DNA-Sequenzierung erfasst. Die Arbeitsgruppe um *Balavoine* konnte diese Möglichkeit für die Detektion ausschließlich eines mutierten *SLC12A3*-Allels in ihrem Kollektiv allerdings verneinen [3]. Zusätzlich mögen epigenetische Einflüsse oder *silent mutations* die Proteinfunktion beeinflussen [72]. Theoretisch ist natürlich auch der Einfluss anderer Gene bei der Vielzahl beteiligter Transportproteine möglich, die die transepitheliale Salzresorption im distalen Tubulus sicherstellen und regulieren. Bisher gibt es hierfür allerdings keinerlei Evidenz. Auch im Vorfeld dieser Arbeit sind heterozygote Mutationen im basolateralen Chloridkanal CLC-Kb ausgeschlossen worden.

Unter den identifizierten Mutationen führen neun zu Aminosäuren-Substitutionen. Dies entspricht ungefähr der in der Literatur beschriebenen Häufigkeit von zwei Dritteln [37,46]. Allein fünf Aminosäuren-Substitutionen treffen den intrazellulären C-Terminus, während die übrigen diffus über das gesamte NCCT Protein verteilt sind. Unsere Arbeiten unterstützen die Hypothese von Lemmink, der ebenfalls über eine Häufung von Mutationen im C-Terminus berichtete [46].

Der C-Terminus wird als wichtige Regulationsstelle für die Aktivität des NCCT-Kotransporters diskutiert, u.a. sind hier zahlreiche Phosphorylierungsstellen lokalisiert [46]. Die Bedeutung der Phosphorylierung für die NCCT-Aktivität wurde durch die Aufklärung einer anderen Erkrankung unterstrichen. Mutationen in den WNK-Kinasen 1 bzw. 4 führen zu dem Phänotyp des Pseudohypoaldosteronismus Typ II (OMIM-Nr.145260), einer autosomal

dominanten „Plus“-Erkrankung mit gesteigerter distaler Salzresorption, die sich in arterieller Hypertension, Hyperkaliämie, metabolischer Azidose und Hyperkalziurie manifestiert und damit das Spiegelbild zum Gitelman-Syndrom abbildet. Pathogenetisch relevant ist eine Überaktivität des NCCT-Transports. Folgerichtig ist die *first-line*-Behandlung dieser Patienten die Einnahme von Thiazid-Diuretika. Obwohl die molekularen Strukturen der Phosphorylierung durch die WNK1/4 im Detail noch ungeklärt sind, fokussiert sich die Forschung doch auf die intrazellulären C-terminalen Abschnitte des NCCT-Proteins [99].

4.4 Genotyp-Phänotyp-Vergleich

In dem klinisch heterogeneren Kollektiv trugen 20 Patienten oder gut 70 Prozent *SLC12A3*-Mutationen. Abb. 4-2 illustriert die Verteilung der Mutationen auf die Phänotypen.

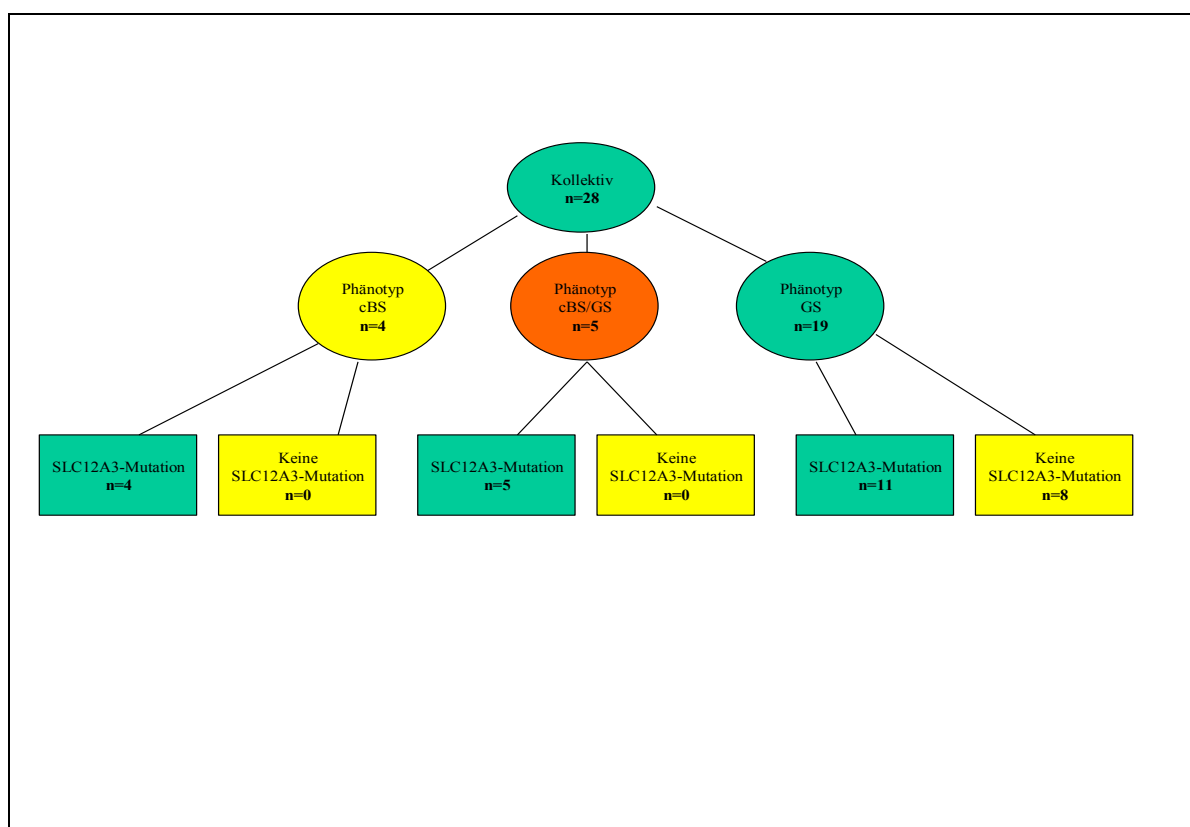


Abbildung 4-2 Phänotyp-Genotyp-Korrelation

In 11 der 19 Patienten mit GS-Phänotyp gelang der Mutationsnachweis, hingegen blieben in knapp 40 Prozent der GS-Patienten unsere Mutationsanalysen unergiebig. Umso erstaunlicher steht daneben die positive Bilanz in der Kohorte der cBS-Patienten und der Patienten mit aufgrund unzureichender Datenlage uneindeutigem Phänotyp, die sich ohne Ausnahme als Träger von *SLC12A3*-Mutationen herausstellten. An diese Beobachtungen lassen sich zwei interessante Überlegungen knüpfen:

- (1) Gibt es in der Kohorte der GS im Spektrum der klinischen Merkmale Unterschiede zwischen denen mit und ohne Mutationsbefund? Wenn ja, ließe sich daraus eine neue Krankheitsentität mit eigenem genetischen Hintergrund postulieren?
- (2) Wenn sich wie jetzt die bisherige Annahme, nur *SLC12A3*-Mutationen führen allein zum Gitelman Syndrom, als zu puristisch, zu eng gefasst erweist, welche nierenphysiologischen Implikationen lassen sich ableiten?

Ad (1) Eine Gegenüberstellung der *SLC12A3*-Mutationen bei positiven und negativen GS-Patienten zeigen folgende beiden Tabellen:

	7622	7611	7612	7140	7221	7222	7576	7396	7139	7471	7472
Hypokaliämie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
metabol. Alkalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hypomagnesiämie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hypokalziurie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Renin-Erhöhung	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+	+	+	Ø	Ø
Aldosteron-Erhöhung	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+	+	+	Ø	Ø
Konsanguinität	+	Ø	Ø	+	+	+	+	-	+	-	-
Nationalität	T	G	G	T	G	G	I	D	T	CH	CH
Polyhydramnion	Ø	-	-	Ø	-	-	-	Ø	-	-	-
Frühgeburtlichkeit	Ø	-	-	-	-	-	-	Ø	-	-	-
Iso-/Hypothenurie	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	-	-	-	-	-
Nephrokalzinose	Ø	-	-	Ø	-	-	-	-	-	-	-
Wachstumsstörung	+	Ø	Ø	Ø	-	-	+	Ø	-	-	-
Salzhunger	Ø	+	+	Ø	Ø	Ø	+	Ø	+	+	+
Klinische Symptome	MK	Ø	Ø	Lab	Ø	Ø	EGe	Lab	Lab	MK	Lab
Alter bei Erstmanifestation	Ø	5,5J	8J	Ø	Ø	Ø	2,5J	21J	2,5J	14J	9J
Kopplung	Ø	Ø	Ø	+	+	+	+	Ø	+	+	+
Phänotyp	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS
Mutation <i>SLC12A3</i> -Gen	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-

Tab. 4-2 Gitelman Kohorte mit Nachweis einer *SLC12A3* -Mutation

	7609	7610	7293	7294	7624	7242	7243	7470
Hypokaliämie	+	+	+	+	+	+	+	+
metabol. Alkalose	+	+	+	+	+	+	+	+
Hypomagnesiämie	+	+	+	+	+	+	+	+
Hypokalziurie	+	+	+	+	+	+	+	+
Renin-Erhöhung	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø	Ø	+
Aldosteron-Erhöhung	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø	Ø	-
Konsanguinität	Ø	Ø	+	+	Ø	-	-	Ø
Nationalität	G	G	T	T	D	B	B	T
Polyhydramnion	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-	-
Frühgeburtlichkeit	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-	-
Iso-/Hyposthenurie	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-	-
Nephrokalzinose	-	-	-	-	Ø	-	-	-
Wachstumsstörung	Ø	+	-	+	Ø	-	-	+
Salzhunger	+	+	+	+	+	+	+	+
Klinische Symptome	Ø	EGe	MK	MK	Ø	Ø	Ø	ND
Alter bei Erstmanifestation	8,5J	1 M	8J	12J	23J	Ø	Ø	5J
Kopplung	Ø	Ø	+	+	Ø	+	+	Ø
Phänotyp	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS
Mutation <i>SLC12A3</i> -Gen	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Tab. 4-3 Phänotyp der Gitelman-Kohorte ohne definierten Genotyp

Mutation *SLC12A3*-Gen -/- keine Mutation; Mutation *SLC12A3*-Gen +/- eine heterozygote Mutation; Mutation *SLC12A3*-Gen +/+ homozygote bzw. compound heterozygote Mutation, + Merkmal erfüllt; - Merkmal nicht erfüllt; Ø keine Angaben; CH Schweiz; I Israel; D Deutschland; B Belgien; T Türkei; G Gipsy; S Spanien; J Lebensjahr; M Lebensmonat; GS Gitelman Syndrom; cBS klassisches Bartter Syndr., cBS/GS unklarer Phänotyp, EGe Erbrechen u. Gedeihstörung, Lab Labordiagnose bei interkurierendem Infekt/präoperativ/Screening bei betroffenem Geschwister, MK Muskelkrämpfe, ND neurologische Erkrankung

In diesen beiden Kohorten zeigt sich keine Häufung nach geographischen Regionen oder Ethnien; das Alter bei Erstmanifestation, das auch als ein Parameter für den Schweregrad der Erkrankung herangezogen werden kann, variiert in beiden Gruppen weit. In der *SLC12A3*-Mutation-negativen Fraktion scheint der Trend zu Wachstumsstörungen ausgeprägter. Eine genotypisch wie phänotypisch neue Entität aus diesem Gruppenvergleich zu postulieren, lässt sich zunächst kaum halten, zumal unsere Untersuchungen auch nicht einen formal genetischen Beweis für weitere genetische Heterogenität des GS erbrachten. Die Haplotypen beider informativen (konsanguinen) GS-Familien ohne *SLC12A3*-Mutation waren vollständig vereinbar mit einer Kopplung der Erkrankung an den *SLC12A3*-Lokus. Die Schlussfolgerung lag nahe, dass die Mutationen schlicht infolge der unzureichenden Sensitivität nicht detektiert wurden. Eine subtilere Betrachtung zu diesem Zeitpunkt hätte aber auch hervorbringen können, dass die Gruppe der genetisch nicht definierten GS-Patienten selbst klinisch heterogen ist und insbesondere Patient 7470 durch Komorbiditäten heraussticht. Neben der Tubulopathie litt dieser Patient an Epilepsie, Ataxie und Innenohr-Schwerhörigkeit. Die Verbindung von Tubulopathie und zentralnervöser Erkrankung hätte bereits damals in die Richtung einer *Channelopathy* weisen können. Diese Einsicht blieb aber Böckenhauer et al.

vorbehalten, der gut vier Jahre nach Abschluss unserer Untersuchungen Mutationen im Kalium-Kanal Kir4.1 als Ursache des EAST-Syndroms erstmalig beschrieb, das exakt oben beschriebene Facetten (Epilepsy, Ataxia, Sensorineural deafness, Tubulopathy) einschliesst[10]. Kir4.1 ist in Epithelzellen des distalen Tubulus und der Stria vascularis des Innenohrs sowie in Gliazellen exprimiert. Die physiologische Funktion des Kalium-Kanals ist das Kalium-Recycling aus dem Interstitium in enger Kooperation mit der Na/K-ATPase. Eine spätere Untersuchung des Patienten 7470 bestätigte die Mutation im Kir4.1 Kanal.

Ad (2). Auch ohne Berücksichtigung der fünf Patienten mit unzureichender Datenlage unterstreichen bereits die vier *SLC12A3* Mutation-positiven cBS-Patienten eine höhere Variabilität des klinischen Phänotyps als bisher bekannt. Dabei haben Art (missense-, frameshift- oder splice site-Mutation) oder Ort der Mutation keinen Einfluss auf die Expression des Phänotyps. Kaum eine der hier nachgewiesenen Mutationen bzw. deren angenommenen Auswirkungen auf Transkription und Translation bleibt reserviert für den vermeintlich schwereren Phänotyps des cBS. So wird die beim compound heterozygoten cBS-Patienten 7603 nachgewiesene G729V-Mutation von Cruz et al. auch in Verbindung mit dem Gitelman-Syndrom zitiert [17]. Der compound heterozygote GS Patient 7396 trägt zwei Nonsense-Mutationen, die beide kaum die Synthese eines intakten NCCT-Moleküls erwarten lassen, ebenso wie der homozygote cBS 7606, der durch Leserahmenverschiebung und vorzeitigen Translationsabbruch den C-Terminus des NCCT-Moleküls einbüßen wird. Den vielleicht besten Beweis für den Mangel einer strengen Genotyp-Phänotyp Beziehung liefert aber die Dissoziation der Phänotypen innerhalb des zweieiigen Zwillingspaars 7576/7. Beide weisen denselben *SLC12A3*-Genotyp mit gleich zwei homozygoten Punktmutationen auf. Aber während einer der Zwillinge neben der pathognomonischen GS-Labortrias einen klinisch beinahe inapparenten Verlauf zeigte, präsentierte sich der andere mit Polyurie und einer vom Säuglingsalter an bestehenden Gedeihstörung. Hingegen zeigte Letzterer keine ausgeprägte Störung des renalen Kalzium- und Magnesium-Handlings und wurde folgerichtig als cBS diagnostiziert.

Da hier erstmals gezeigt wurde, dass auch *SLC12A3*-Mutationen als Ursache des cBS Phänotyp erwogen werden müssen und *vice versa* in der Literatur bereits wiederholt Patienten mit GS-Phänotyp als Folge von *CLCNKB*-Mutationen beschrieben wurden [36,100], dann weist dies auf eine enge funktionelle Kooperation und auf das physiologische Zusammenspiel beider Genprodukte, NCCT und CLC-Kb, hin. Im distalen Tubulusepithel erfolgen die NaCl-

Resorption über die apikale Membran via NCCT und der basolaterale Cl-Efflux via ClC-Kb. Energetisiert wird dieser sekundär aktive Transport durch die energieabhängige Na/K-ATPase. Eine noch junge Erkenntnis ist, dass deren Funktion an ein Recycling des Kaliums aus dem Interstitium via Kir4.1 gebunden ist[10]. Abbildung 4-4 zeigt diese „Module“, die in der Gesamtheit den Prozess der Salzresorption im DCT konstituieren. Der Ausfall nur eines Moduls führt zum Erliegen des Resorptionsprozesses, und mündet unabhängig davon, welches Modul in Einzelfall betroffen ist, in einem ähnlichen *renalen* Phänotyp.

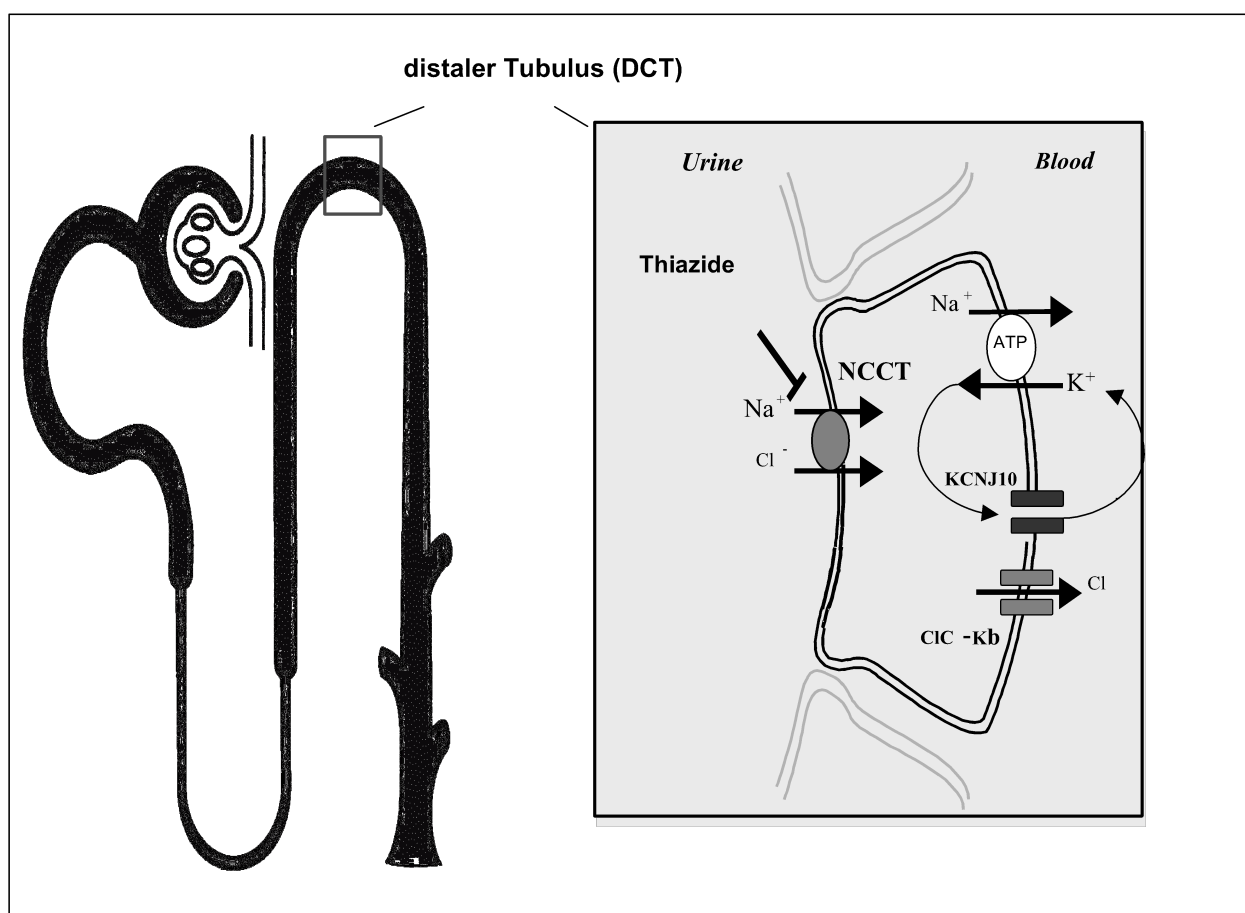


Abbildung 4-2: NaCl-Resorption im DCT: apikaler NaCl-Eintritt über apikalen NCCT, basolateraler Austritt von Natrium über Na/K-ATPase, Chlorid via Chloridkanal ClC-Kb, Kalium-Recycling in der basolateralen Membran durch Kaliumkanal Kir4.1 (im Bild KCNJ10)

Die mit dieser Arbeit weiter gefestigten Erkenntnisse zur Physiologie des Salztransports im distalen Nierentubulus erklären die nicht seltene klinische Erfahrung, dass an der Bettseite häufig nicht aufzulösen ist, ob der Patient eine defizitäre Funktion des NCCT oder ClC-Kb hat. Auch die historisch bedingte strenge Trennung von GS und cBS ist kaum weiterführend. Sinnvoll erscheint eine Neuordnung der Nomenklatur, in der der heute hinreichend bekannten Pathophysiologie auch entsprechend und in anschaulicher Weise Rechnung getragen wird.

Ein diskutabler Vorschlag wäre, in Zukunft bei einer Erkrankung der tubulären NaCl Rückresorption mehr das Störungsniveau bzw. das defizitäre Tubulussegment zu fokussieren, und damit die Erkrankung des distalen Tubulus (DCT-Erkrankung) von der Erkrankung der Henleschen Schleife (Schleifen-Erkrankung) abzugrenzen.

5 Zusammenfassung

Das Gitelman-Syndrom (GS) gehört in die Gruppe der hereditären hypokaliämischen Salzverlust-Tubulopathien (HSLT). Gemeinsames Kennzeichen der HSLT ist die gestörte Chlorid-Reabsorption im distalen Nephron, die zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und konsekutiv zu Hypokaliämie und metabolischer Alkalose führt. Das GS definiert sich darüber hinaus durch die Koinzidenz von renal bedingter Hypomagnesiämie und Hypokalziurie. Der Erkrankungsbeginn ist sehr variabel; in der eigenen Patientenklientel zeigten mehr als zwei Drittel der Patienten Symptome oder Serum-Elektrolytveränderungen vor oder mit Beginn der Adoleszenz [63]. Klinische Zeichen sind Salzhunger und muskuläre Schwäche, seltener neurologische Manifestationen wie Parästhesien, Carpopedalspasmen und Tetanien. Häufig bestehen nur unspezifische Beschwerden wie Antriebslosigkeit und körperlicher wie mentaler Leistungsabfall. Enuresis und Kleinwuchs sind ebenfalls höher prävalent. Richtungsweisend ist dann die typische Laborkonstellation aus Hypokaliämie und Hypomagnesiämie. Fatale Herzrhythmusstörungen sind in Einzelfällen beschrieben [80].

Die genetische Grundlage des GS sind Mutationen im *SLC12A3*-Gen, das für den thiazidsensitiven Natrium-Chlorid-Kontransporter (NCCT) des distalen Nierentubulus kodiert [85]. Die Vererbung ist autosomal-rezessiv. Mehr als 100 Mutationen im *SLC12A3*-Gen wurden beschrieben, und bislang galt das GS als genetisch und klinisch homogenes Krankheitsbild. Befunde aus dem eigenen Labor stellen diese monolithische Vorstellung in Frage, nachdem bei einigen wenigen Patienten mit typischer GS-Symptomtrias Mutationen in dem *CLCNKB*-Gen nachgewiesen worden sind [36]. *CLCNKB* kodiert den basolateralen renalen Chlorid-Kanal ClC-Kb. NCCT und ClC-Kb sind im Tubulusepithel des distalen Konvoluts (DCT) oppositionell exprimiert; die molekulare Integrität und das Zusammenwirken beider Moleküle sind essentiell für die transepitheliale Chlorid-Reabsorption [2]. Häufiger noch führen Mutationen im *CLCNKB*-Gen allerdings zum klassischen Bartter-Syndrom (cBS) mit Erstmanifestation bereits im Säuglingsalter, unter anderem durch Polyurie und Gedeihstörung [63,64,86].

In der vorliegenden Arbeit wurden 28 Patienten mit renalem Salzverlust (19 GS-, 4 cBS-, sowie 5 cBS/GS-Phänotyp) auf Mutationen im *SLC12A3*-Gen untersucht. *CLCNKB*-Mutationen waren in dem Kollektiv zuvor ausgeschlossen worden. Bei allen acht informativen Familien war die Kopplungsuntersuchung vereinbar mit Beteiligung des

SLC12A3-Gens, in sechs der acht Familien wurden Mutationen tatsächlich nachgewiesen. Insgesamt wurden bei 20 Patienten (71 % Detektionsrate) Mutationen im *SLC12A3*-Gen entdeckt (homozygot n=11, compound heterozygot n=2, heterozygot n=7). Dreizehn verschiedene Mutationen wurden detektiert; diese verteilen sich auf 9 Missense-, 2 Nonsense- und 2 donor splice site-Mutationen. Fünf Mutationen sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Die Mehrzahl der Mutationen befinden sich im C-Terminus des NCCT, eine wichtige Regulationstelle für die Aktivität des Kotransporters [46]. Alle Mutationen im NCCT-Molekül liegen an hochkonservierten Aminosäure-Positionen in der Familie der elektroneutralen Kation-Chlorid-Kotransporter. Ihre pathogenetische Relevanz ist hochwahrscheinlich, auch wenn funktionelle Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden.

Elf von 19 Patienten mit typischem GS-Phänotyp zeigten erwartungsgemäß Mutationen im *SLC12A3*-Gen. Aber auch 4 Patienten mit klinischen Merkmalen des cBS erwiesen sich als Träger von *SLC12A3*-Mutationen. Der Fall eines dizygoten Zwillingspaars illustriert exemplarisch die variable Manifestation von *SLC12A3*-Mutationen. Beide Zwillinge sind Träger der gleichen homozygoten *SLC12A3*-Mutationen und präsentieren sich doch mit unterschiedlichem Phänotyp, der eine mit GS, der andere mit cBS. Der Phänotyp von *SLC12A3*-Mutationen zeigt sich in dieser Arbeit in größerer klinischer Bandbreite als bisher vermutet, z.B. war gut ein Viertel kleinwüchsig. Eine Korrelation zwischen Art und Ort der Mutation und der Schwere des Phänotyps konnte nicht hergestellt werden.

Die historisch begründete Trennung von GS und cBS sollte in dieser apodiktischen Schärfe nicht weiter beibehalten werden. Sowohl grundlegende Überlegungen zur (Patho)Physiologie sowie Erfordernisse der klinischen Praxis lassen es korrekter und zweckmäßiger erscheinen, von einer gemeinsamen Erkrankung des distalen Konvoluts zu sprechen, der DCT-Erkrankung.

6 english summary

Gitelman's syndrome (GS), an autosomal recessive salt-losing tubulopathy, is characterized by the combination of hypokalemic alkalosis, hypomagnesemia and hypocalciuria. The clinical onset covers a broad spectrum of symptoms – of our study group more than two thirds of all patients presented with symptoms or electrolyte abnormalities before or at beginning of adolescence. Due to unspecific symptoms such as salt craving, weakness and fatigue, the diagnosis of GS is largely based on detection of the typical electrolyte constellation. Specific neuromuscular presentations such as carpopedal spasms, tetany and paresthesia are rarely seen [63] and, moreover, severe manifestations such as chondrocalcinosis, rhabdomyolysis, seizures and fetal ventricular arrhythmia have been reported only in a very limited number of cases [80].

GS is associated with inactivating mutations in the *SLC12A3* gene, which encodes for the thiazid-sensitive sodium-chloride-cotransporter (NCCT) that is expressed in the apical membrane of the cells lining the distal convoluted tubule (DCT) [85]. More than 100 different mutations of the *SLC12A3* gene have been identified so far. However, the classical view of GS as a genetically homogeneous disorder linked to *SLC12A3* has been disturbed by the identification of mutations in the *CLCNKB* gene, which may also be coincident with electrolyte abnormalities characteristic for GS [36]. Nevertheless, *CLCNKB* mutations more commonly lead to Bartter syndrome (cBS), another salt-losing tubulopathy which manifests in the first year of life with polyuria and failure to thrive [63, 64, 84]. *CLCNKB* codes for the basolaterally expressed renal chloride channel (ClC-Kb). Both, NCCT and ClC-Kb, are expressed oppositionally in the DCT cell and are crucial for the transcellular chloride reabsorption [2].

In the present study, 28 patients from 22 different families presenting with a hypokalemic saltlosing tubulopathy (19 GS-, 4 cBS-, 5 cBS/GS phenotype) were screened for mutations in the *SLC12A3* gene. The occurrence of *CLCNKB* mutations in these patients could be excluded. Interestingly, all 8 informative families showed cosegregation with the *SLC12A3* locus, but *SLC12A3* mutations could be detected in only 6 families. In summary, 20 patients harboured mutations in the *SLC12A3* gene (71% detection rate; 11 homozygous, 2 compound heterozygous, 7 heterozygous) and 13 different mutations could be identified (9 missense, 4 nonsense mutations: 2 deletions and 2 donor splice site mutations). Intriguingly, of all 13 mutations detected in our patient cohort, five haven't been described before and can be considered as novel *SLC12A3* mutations for GS. The majority of these mutations are placed in

the intracellular C-terminal-domain, an important regulatory element for transporter activity [46]. Moreover, all NCCT mutations affect evolutionary highly conserved aminoacid residues within the cation-chloride-cotransporter family. Although functional analysis of the detected mutations are not covered in this study, it is tempting to speculate that these mutations drastically impair NCCT function.

11 of 19 patients with the typical GS-phenotype presented according to expectation mutations in the *SLC12A3* gene. Surprisingly, all 4 patients with the clinical phenotype of cBS also harboured *SLC12A3* mutations. Interestingly, in a case of dizygous twins with two identical homozygous *SLC12A3* mutations, one presented with the classical GS features and the other one with the clinical picture of cBS. This example highlights the variable expression of *SLC12A3* mutations.

In this study the phenotype of *SLC12A3* mutations was associated with a broader clinical spectrum than expected. In addition, neither nature nor position of the detected mutations had an impact on the severity of the phenotype.

In summary, these new insights demonstrate that the historical differentiation between GS and cBS is overage. From a clinical and pathophysiological point of view it appears to be more practicable to consider both, GS and cBS, as one common disease of the renal distal tubule - the DCT disease.

7 Literaturverzeichnis

1. Ammenti A, Montali S: Neonatal variant of Bartter syndrome presenting with acidosis. *Pediatr Nephrol* 1996; 10:79-80
2. Bachmann et al.: Sodium transport-related proteins in the mammalian distal nephron-distribution, ontogeny and functional aspects. *Anat Embryol* 1999; 2000:447-468
3. Balavoine AS et al.: Phenotype-genotype correlation and follow-up in adult patients with hypokalemia of renal origin suggesting Gitelman Syndrome. *Eur J Endocrinol* 2011; 165(4): 665-73.
4. Bartter FS, Pronove O, Gill JR, Mac Cardle RC: Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. *Am J Med* 1962; 33:811-828
5. Bettinelli A et al.: Gitelman disease associated with growth hormone deficiency, disturbance in vasopressin secretion and empty sella: a new hereditary renal tubular-pituitary syndrome? *Pediatr Res* 1999; 46:232-238
6. Bettinelli A et al.: Long term evaluation of a patient with Gitelman's syndrome. *Pediatr Nephrol* 1994; 7:67-68
7. Bettinelli A et al.: Use of calcium excretion values to distinguish two forms of primary renal tubular hypokalemic alkalosis: Bartter and Gitelman syndromes. *J Pediatr* 1992;120:38-42
8. Bettinelli A., Casari G, Mastroianni N, Ciurmatori S, Leozappa G: Atypical cases of the hypercalciuric variant of Bartter syndrome: importance of molecular diagnosis. *Pediatr Nephrol* 1997; 11:C49
9. Birkenhäger et al.: Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet* 2001; 29:310-314
10. Bockenhauer et al.: Epilepsy, Ataxia, Sensorineural Deafness, Tubulopathy, and *KCNJ10* Mutations. *N Engl J Med* 2009; 360:1960-70
11. Bostonjoglo M, Reeves WB, Reilly RF et al. : 11β -hydroxysteroid-dehydrogenase, mineralcorticoid receptor and thiazid-sensitive Na-Cl cotransporter expression by distal tubules. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:1347-1358.
12. Chadwick et al.: Heterozygote and mutation detection by direct automated fluorescent DNA sequencing using a mutant Taq DNA polymerase. *Bio Techniques* 1996; 20:676-683
13. Cole DE, Quamme GA: Inherited disorders of renal magnesium handling. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:1937-1947
14. Colussi G et al.: Calcium metabolism and calciotropic hormone levels in Gitelman's syndrome. *Miner Electrolyt Metab* 1994; 20:294-301
15. Colussi G et al.: Abnormal reabsorption of Na/Cl by the thiazid-inhibitable transporter of the distal convoluted tubule in Gitelman's syndrome. *Am J Nephrol* 1997; 17:103-111
16. Coto et al.: A new mutation (intron 9+1 G>T) in the SLC12A3 gene is linked to Gitelman syndrome in Gypsies. *Kidney Int* 2004; 65:25-29
17. Cruz et al. : Gitelman's syndrome revisited: an evaluation of symptoms and health-related quality of life. *Kidney Int* 2001; 59:710-717
18. De Bellis et al.: A more stringent choice of primers can improve the performance of flurescent automated DNA sequencers. *Bio Techniques* 1992; 13:892-897
19. Dean M et al.: Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. *Cell* 1990; 61:863-870

20. De La Faille R et al.: A pseudo-dominant form of Gitelman's syndrome. *NDT Plus* 2011 ; 0 :1-4
21. Delpire et al.: The Na(K)Cl cotransporter family in the mammalian kidney: molecular identification and function(s). *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11:1967-1973
22. Demers DB, Odelberg SJ, Fisher LM: Identification of a factor IX point mutation using SSCP analysis and direct sequencing. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:5575
23. Dib C et al.: A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites. *Nature* 1994; 380:152-154
24. Dørup J: Ultrastructure of three-dimensionally localized distal nephron segments in superficial cortex of the rat kidney. *J Ultrastruct Res* 1998 ; 99 : 169-187.
25. Ellison DH: Divalent cation transport by the distal nephron: insights from Bartter's and Gitelman's syndromes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279:F616-625
26. Gamba A et al.: Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 1994; 269:17713-17722
27. Gamba et al.: Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazid-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90:2749-2753
28. Gesek FA, Fridman PA: Mechanism of calcium transport stimulated by chlorothiazid in mouse distal convoluted tubule cells. *J Clin Invest* 1992; 90:429-438
29. Gil-Pena et al.: Longitudinal growth in chronic hypokalemic disorders. *Pediatr Nephrol* 2010; 25:733-737
30. Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG: A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Physicians* 1966;79:221-235
31. Greger : Renale Wirkmechanismen der Diuretika. *Nieren-und Hochdruckkrankheiten* 1996; 4:136-146
32. Günther T: Mechanisms and regulation of Mg^{2+} efflux and Mg^{2+} influx. *J Miner Electrolyte Metab* 1993; 19: 259-265
33. Herrero-Morin JD et al.: Gitelman syndrome in Gypsy paediatric patients carrying the same intron 9+1 G>T mutation. Clinical features and impact on quality of life. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26:151-155.
34. International Collaborative Study Group for Bartter-like Syndromes: Mutations in the gene encoding the inwardly rectifying renal potassium channel, ROMK, causes the antenatal variant of Bartter Syndrome: evidence for genetic heterogeneity. *Hum Mol Genet* 1997;6:17-26
35. Jeck N et al.: Hypokalemic salt-losing tubulopathy with chronic renal failure and sensorineural deafness. *Pediatrics* 2001;108: 5-10.
36. Jeck N et al.: Mutations in the chloride channel gene *CLCNKB*, leading to a mixed Bartter-Gitelman phenotype. *Pediatr Res* 2000; 48:754-758
37. Knoers N, Levtchenko E: Gitelman syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2008; 3:22 1-6
38. Köckerling A, Konrad M, Barth H, Seyberth HW, Leonhardt A: Prä- und postnatales Management des Hyper-PGE-Syndroms bei nachgewiesener ROMK-Mutation. *Z Geburt Neonatol* 1997; 201:223
39. Köckerling A, Reinalter SC, Seyberth HW: Impaired response to furosemid in hyperprostaglandin E syndrome: evidence for a tubular defect in the loop of Henle. *J Pediatr* 1996; 129:519-528.
40. Köckerling A, Konrad M, Seyberth HW: Hereditäre Tubulopathien mit Diuretika-ähnlichem Salzverlust. *Dt Arztebl* 1998; 95: A-1841-1846 [Heft 30]

41. Konrad M, Köckerling A, Leonhardt A, Karolyi L, Seyberth HW: Pre- and postnatal diagnosis of hyperprostaglandin E syndrome following molecular diagnosis from amniocytes. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8:90A
42. Krawczak M, Reiss J, Cooper DN: The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 1992; 90:41
43. Kunchaparty et al.: Defective processing and expression of thiazid-sensitive Na-Cl cotransporter as a cause of Gitelman's syndrome. *Am J Physiol* 1999; 277 (Renal Physiol 46): F643-649
44. Landau D et al.: Infantile variant of Bartter syndrome and sensorineural deafness: a new autosomal recessive disorder. *Am J Med Genet* 1995;59:454-459
45. Lelièvre-Pegorier et al.: Developmental pattern of water and electrolyte transport in rat superficial nephron. *Am J Physiol* 1983; 245:F15-F21
46. Lemmink et al.: Novel mutations in the thiazid-sensitive Na Cl cotransporter gene in patients with Gitelman syndrome with predominant localization to the C-terminal domain. *Kidney Int* 1998; 54:720-730
47. Löffing J et al.: Distribution of transcellular calcium and sodium transport pathways along mouse distal nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281:F1021-F1027
48. Löffing J et al.: Thiazid treatment of rats provoke apoptosis in distal tubule cells. *Kidney Int* 1996; 50:1180-1190
49. Löffler G, Petrides PE: *Biochemie und Pathobiochemie*, 5. Auflage:33-83, Springer, Berlin Heidelberg 1997
50. Lüthy C et al.: Normal prostaglandinuria E₂ in Gitelman's syndrome, the hypocalciuric variant of Bartter's syndrome. *Am J Kidney Dis* 1995; 25:824-828
51. Mashiyama S et al.: Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene* 1991; 6:1313-1318
52. Mastroianni N et al.: Molecular cloning, expression pattern and chromosomal localization of the human Na Cl thiazid-sensitive cotransporter (SLC12A3). *Genomics* 1996; 35:386-393
53. Mastroianni N et al.: Novel molecular variants in thiazid-sensitive Na-Cl-cotransporter are responsible for Gitelman syndrome. *Am J Hum Genet* 1996; 59:1019-1026
54. Maxam AM, Gilbert W: A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74:560-564
55. McCredie DA, Rotenberg E, Williams AL: Hypercalciuria in potassium-losing nephropathy: a variant of Bartter's syndrome. *Aust Pediatric J* 1974;10:286-295
56. Mullis KB, Faloona FA : Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-350
57. Nijenhuis T et al.: Enhanced passive Ca²⁺ reabsorption and reduced Mg²⁺ channel abundance explains thiazid-induced hypocalciuria and hypomagnesemia. *J Clin Invest* 2005; 115:1651-1658
58. Nozu et al.: A deep intronic mutation in the SLC12A3 gene leads to Gitelman syndrome. *Pediatr Res* 2009, epub
59. Obermüller N, Bernstein PL, Velazquez H et al. : Expression of the thiazid-sensitive Na-Cl cotransporter in rat and human kidney. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 1995; 269:F900-F910.
60. Ohlsen et al.: A variant of Bartter's syndrome associated with hydramnions, prematurity, hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Acta Paediatr Scand* 1984; 73:868-874
61. Orita et al.: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:2766-2770

62. Orita M et al.: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5:868-874
63. Peters M et al.: Clinical presentation of genetically defiend patients with hypokalemic salt-losing tubulopathies. *Am J Med.* 2002; 15:112(3):235-6.
64. Peters M, Jeck N, Seyberth HW, Konrad M: Hereditary hypokalemic salt-losing tubulopathies: bartter-like syndromes. *Contrib Nephrol.* 2001;(136):157-73.
65. Proesmans W, Massa G, Vanderberghe K, Assche AV: Prenatal diagnosis in Bartter syndrome. *Lancet* 1987; I:394
66. Proesmans W: Bartter syndrome and its neonatal variant. *Eur J Pediatr* 1997; 156:669-679
67. Quamme GA: Renal magnesium handling: new insights in understanding old problems. *Kidney Int* 1997; 52:1180-1195
68. Reilly et al.: Immunolocalization of the Na/Ca exchanger in rabbit kidney. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 1993; 265:F327-F332
69. Reilly RF, Ellison DH : Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiol Rev* 2000; 80:277-313
70. Reinalter SC et al.: Evaluation of long-term treatment with indomethacin in hereditary hypokalemic salt-losing tubulopathies. *J Pediatr* 2001; 139(3):398-406.
71. Rodriguez-Soriano J : Bartter and related syndromes: the puzzle is almost solved. *Pediatr Nephrol* 1998; 12:315-327
72. Riviera-Munoz E et al.: Gitelman`s syndrome: towards genotype-phenotype correlations? *Pediatr Nephrol* 2007; 22:326-332
73. Riviera-Munoz E et al.:Transcriptional and Functional Analyses of *SLC12A3* Mutations: New Clues for the Pathogenesis of Gitelman Syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:1271-1283
74. Ring T et al.: Reevaluation of the criteria for the clinical diagnosis of Gitelman syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2002; 17(8):612-616
75. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR : DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74:5463-5467
76. Sarkar G, Yoon HS, Sommer SS : Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucleic Acid Res* 1992; 20:871-878
77. Schlingmann KP et al.: Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of TRPM gene family. *Nat Genet* 2002; 31:166-170
78. Schlingmann KP et al.: Salt wasting and deafness resulting from mutaton in two chloride channels. *N Engl J Med* 2004; 350: 1314-1319.
79. Schultheis et al.: Phenotype resembling Gitelman`s syndrome in mice lacking the apical Na-Cl cotransporter of the distal convoluted tubule. *J Biological Chemistry* 1998; 44: 29150-29155
80. Scognamiglio R, Negut C, Calo LA: Aborted sudden cardiac death in two patients with Bartter`s/Gitelman`s syndromes. *Clin Nephrol* 2007; 67:193-197
81. Seyberth HW et al.: Congenital hypokalemia with hypercalciuria in preterm infants: a hyperprostaglandinuric tubular syndrome different from Bartter syndrome. *J Pediatr* 1985;107:694-701
82. Shafik IM, Quamme GA: Early adaption of renal magnesim reabsorption in response to magnesium restriction. *Am J Physiol* 1999; 257:F974-F977
83. Simon et al.: Bartter`s syndrome, hypokalemic alkalosis with hypercalciuria is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet* 1996; 13:183-188
84. Simon et al.: Genetic heterogeneity of Bartter`s syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel ROMK. *Nat Genet* 1996; 14:152-156

-
85. Simon et al.: Gitleman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazid-sensitive Na Cl cotransporter. *Nat Genet* 1996; 12:24-36
 86. Simon et al.: Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, causes Bartter's syndrome type III. *Nat Genet* 1997; 17:171-178
 87. Simon et al.: Paracellin-1, atight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 1999; 285:103-106
 88. Smilde TJ et al.: Familial hypokalemia/hypomagnesemia and chondrocalcinosis. *J Rheumatol* 1994; 21:1515-1519
 89. Sutton RA et al.: Bartter's syndrome: evidence suggesting a distal tubular defect in ahyppocalciuric variant of the syndrome. *Miner Electrolyte Metab* 1992;18:43-51
 90. Syren et al.: Identification of fifteen novel mutations in in the SLC12A3 gene encoding the Na-Cl co-transporter in Italian patients with gitelman syndrome. *Hum Mutat* 2002; 20(4):321
 91. Turman MA: Concomitant occurrence of Gitelman and Bartter syndromes in the same family? *Pediatr Nephrol* 1998; 12:23-25
 92. Voets T et al.: TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. *J Biol Chem* 2004; 279:19-25
 93. Waldegger et al.: Barttin increases surface expression and changes current properties of CLC-K channels. *Pflugers Arch* 2002; 444:411-418
 94. Walsh SB et al.: Does hypokalemia cause nephropathy? An observational study of renal function in patients with Bartter or Gitelman syndrome. *QJMed* June 2011, epub
 95. Wang et al.: A potassium channel in the apical membrane of rabbit thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol* 1990; 258:F244-F253
 96. Wang R, Oei TO, Hamiter T: Frequency of hypomagnesemia associated with hypokalemia in hospitalized patients. *Am J Clin Pathol* 1979; 71:610-615
 97. Weber JL, May PE: Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed by the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; 44:388-396
 98. Yahata et al.: Identification of novel R642C mutation in Na/Cl cotransporter with Gitelman's syndrome. *Am J Kidney Diseases* 1999; 34:845-853
 99. Yang CL, Angell J, Mitchell R, Ellison DH: WNK kinases regulate thiazid-sensitive Na-Cl cotransport. *J Clin Invest* 2003; 111:1039-1045
 100. Zelikovic et al.: A novel mutation in the chloride channel gene, CLCNKB, as a cause of Gitelman and Bartter syndromes. *Kidney Int* 2003; 63:24-32

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

Angaben in [...] sind Maßeinheiten

Ala- Alanin
APS- Ammoniumpersulfat
Arg- Arginin
Asn- Asparagin
Asp- Asparaginsäure
ATP- Adenosintriphosphat
[bp]- Basenpaare
aBS/HPS- antenatales Bartter-Syndrom/ Hyperprostaglandin E-Syndrom
BS- Bartter-Syndrom
cAMP- zyklisches Adenosinmonophosphat
cBS- klassisches (classic) Bartter-Syndrom
cDNA- copyDesoxyribonukleinsäure
CLC-Ka/Kb - Chloridkanäle
[cM]- centiMorgan
Cy5- Cyanin 5
Cys- Cystein
DCT- distales Tubuluskonvolut
DNA- Desoxyribonukleinsäure
dNTP- Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP- Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC- Diethylpyrocarbonat
E- Extinktion
FE- fraktionelle Exkretion
Gln- Glutamin
Glu- Glutaminsäure
Gly- Glycin
GS- Gitelman-Syndrom
His- Histidin
HSLT- hypokalemic salt-losing tubulopathies
Ile- Isoleucin
[kb]- Kilobasenpaare
Kda- Kilo-Dalton
Leu- Leucin
Lys- Lysin
Met- Methionin
NaCl- Natriumchlorid
NCCT- Natrium-Chlorid-Kotransporter
NKCC2- Natrium-Kalium-2Chlorid-Kotransporter
PCR- Polymerase-Chain-Reaction
PGE₂- Prostaglandin E₂
Phe- Phenylalanin

Pro- Prolin
RAAS- Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROMK- renal outer medullary K⁺ (Kaliumkanal)
Ser- Serin
SSCP- Single-Strand-Conformation-Polymorphism
TAL- thick ascending limb (dicker aufsteigender Henle Ast)
TEMED- Tetramethyldiamin
Thr- Threonin
Trp- Tryptophan
Tyr- Tyrosin
SLC12A3- NCCT-Gen
[U]- Unit
[Upm]- Umdrehungen pro Minute
Val- Valin
v/v- Volumen pro Volumen
w/v- Gewicht pro Volumen

8.2 Fragebogen

Fragen zur phänotypischen Charakterisierung von Patienten mit familiären hypokaliämischen Tubulopathien

Patient _____ geb. _____

1. Polyhydramnion

vorhanden ja ☐ nein ☐
Ist das Vorliegen oder
Nicht-Vorliegen gut
dokumentiert? ja ☐ nein ☐

2. Frühgeburtlichkeit

vorhanden ja ☐ _____ SSW nein ☐
Existieren neben etwaig vorgelegenem
Polyhydramnion andere Ursachen der
Frühgeburtlichkeit, wenn ja, welche? ja ☐ _____
_____ ☐
_____ ☐
Konnte keine Ursache für die
Frühgeburtlichkeit eruiert werden? ja ☐ nein ☐

3. Erstmanifestation

- Alter bei Erstmanifestation : _____
- Symptome bei Erstmanifestation : _____

Die Angaben zu den folgenden Kategorien 4-9 sollten bitte den Status des/der Patienten/in vor Beginn einer Indometacin-Therapie oder während einer Therapiepause widerspiegeln! Sind nur Daten unter Indometacin-Behandlung vorhanden, bitten wir Sie, dies zu kennzeichnen.

4. Iso/Hyposthenurie

Geben Sie die maximal erreichte Urinkonzentration an [mosm/kg]: _____

Unter welchen Bedingungen wurde diese Konzentration erreicht?

Morgenurin ☐ Durstversuch ☐ nasaler Minirintest ☐ i.v. Minirintest ☐ andere ☐ _____

Ließ sich dieses Ergebnis reproduzieren?

ja ☐

nein ☐

5. Hyperkalziurie/Hypokalzurie

renalere Kalziumverlust pro Tag oder alternativ Kalzium/Kreatinin-Quotient (bitte unter Angabe der Dimension): _____

reproduzierbar?

ja ☐

nein ☐

6. Nephrokalzinose

vorhanden

ja ☐

nein ☐

7. Hypokaliämie

Geben Sie den niedrigst gemessenen Kaliumwert an: _____ [mmol/l]

Wie häufig sind bei dem/der Patienten/in Hypokaliämien (<3 mmol/l) aufgetreten (nicht berücksichtigt werden sollten hier hypokaliämische Perioden anderer Ursache, z.B. innerhalb einer GE)?

regelmäßig ☐

häufig ☐

selten ☐

einmal ☐

nie ☐

8. Hypomagnesiämie

Setzen Sie den niedrigst gemessenen Mg^{2+} -Wert ein: _____ [Dimension]

Ließ sich dieses Ergebnis reproduzieren?

ja ☐

nein ☐

9. zusätzliche Labordaten

Hypochlorämie (< 97 mmol/l)

☐ ja

☐ nein

erhöhte Plasma-Renin-Aktivität	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
sekundärer Hyperaldosteronismus	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
erhöhte renale Prostaglandin E ₂ - Ausscheidung	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein

10. Längenentwicklung

Kleinwuchs (<3. Perc.) ☐ ja ☐ nein

gemessen im Alter von _____ (Jahre)

Wachstumsentwicklung bisher ☐ normal verzögert ☐

besteht ein STH-Mangel ☐ ja ☐ nein
oder neurosekretorische Dysfunktion ☐ ja ☐ nein

11. Familie

Nationalität _____

Konsanguinität ☐ ja ☐ nein ☐ möglich

andere betroffene Geschwister ☐ ja ☐ nein Anzahl _____

wenn möglich, fertigen sie bitte eine Stammbaumskizze an:

11. aktuelle Therapie: _____

8.3 SLC12A3-Gensequenz (Genbank: NM 000339)

ORIGIN

```

1  ggcacaatgg  cagaactgcc  cacaacagag  acgcctgggg  acgccacttt  gtgcagcggg
61  cgcttcacca  tcagcacact  gctgagcagt  gatgagccct  ctccaccagc  tgcctatgac
121  agcagccacc  ccagccacct  gacccacagc  agcaccttct  gcatgcgcac  ctttggctac
181  aacacgatcg  atgtggtgcc  cacatatgag  cactatgcca  acagcaccca  gcctggtgag
241  ccccggaagg  tccggcccac  actggctgac  ctgcactcct  tcctcaagca  ggaaggcaga
301  cacctgcatg  ccttggcctt  tgacagccgg  cccagccacg  agatgactga  tgggctggtg
361  gagggcgagg  caggcaccag  cagcgagaag  aaccccgagg  agccagtgcg  cttcggctgg
421  gtcaaggggg  tgatgattcg  ttgcatgctc  aacatttggg  gcgtgatcct  ctacctgcgg
481  ctgccctgga  ttacggccca  ggcaggcatc  gtcctgacct  ggatcatcat  cctgctgtcg
541  gtcacggtga  cctccatcac  aggcctctcc  atctcagcca  tctccacca  tggcaaggctc
601  aagtcagggtg  gcacctactt  cctcatctcc  cggagtctgg  gccagagct  tgggggctcc
661  atcggcctca  ttttcgcttt  cgccaatgcc  gtgggtgtgg  ccatgcacac  ggtgggcttt
721  gcagagaccg  tgcgggacct  gctccaggag  tatggggcac  ccatcggtga  cccattaac
781  gacatccgca  tcattggcgt  ggtctcggtc  actgtgctgc  tggccatctc  cctggctggc
841  atggagtggg  agtccaaggc  ccagggtgtg  ttcttccttg  tcatcatggt  ctcccttgcc
901  aactattttag  tggggacgct  gatcccccca  tctgaggaca  aggcctccaa  gggcttcttc
961  agctaccggg  cggacatttt  tgtccagaac  ttggtgcctg  actggcgggg  tccagatggc
1021  accttcttcg  gaatgttctc  catcttcttc  ccctcggcca  caggcatcct  ggcagggggc
1081  aacatatctg  gtgacctcaa  ggacctgtct  atagccatcc  ccaaggggac  cctcatggcc
1141  attttctgga  cgaccttttc  ctacctggcc  atctcagcca  ccattggctc  ctgcgtggtg
1201  cgtgatgcct  ctggggctct  gaatgacaca  gtgacctctg  gctgggggtg  ctgcgagggg
1261  ctggcctgca  gctatggctg  gaacttcacc  gagtgcaccc  agcagcacag  ctgccactac
1321  ggcctcatca  actattacca  gacctatgac  atggtgtcag  gcttcgcgcg  ctgtatcacg
1381  gctggcatct  tcggggccac  cctctcctct  gccctggcct  gccttgtctc  tgttgccaaa
1441  gtcttccagt  gcctttgcga  ggaccagctg  taccactga  tcggcttctt  cggcaaaggc
1501  tatggcaaga  acaaggagcc  cgtgcgtggc  tacctgctgg  cctacgccat  cgctgtggcc
1561  ttcatcatca  tcgctgagct  caacaccata  gccccatca  tttccaactt  cttcctctgc
1621  tcctatgccc  tcataaactt  cagctgcttc  cagcctcca  tcaccaactc  gcctgggtgg
1681  agaccttcat  tccaatacta  caacaagtgg  gcggcgctgt  ttggggctat  catctccgtg
1741  gtcatcatgt  tctcctcac  ctggtgggcg  gccctcatcg  ccattggcgt  ggtgctcttc
1801  ctctgtctct  atgtcatcta  caagaagcca  gaggtaaatt  ggggctcctc  ggtacaggct
1861  ggctcctaca  acctggccct  cagctactcg  gtgggcctca  atgagggtga  agaccacatc
1921  aagaactacc  gccccagtg  cctggtgtct  acggggcccc  ccaacttccg  cccggccctg
1981  gtggactttg  tgggcacctt  cacccggaac  ctccagctga  tgatctgtgg  ccacgtgctc
2041  atcggacccc  acaagcagag  gatgcctgag  ctccagctca  tcgccaacgg  gcacaccaag
2101  tggtgaaca  agaggaagat  caaggccttc  tactcggatg  tcattgccga  ggacctccgc
2161  agaggcgctc  agatcctcat  gcaggccgca  ggtctcggga  gaatgaagcc  caacattctg
2221  gtggttgggt  tcaagaagaa  ctggcagtcg  gctcaccggg  ccacagtgga  agactacatt
2281  ggcatectcc  atgatgcctt  tgagttcaac  tatggcgtgt  gtgtcatgag  gatgcgggag
2341  ggaactcaacg  tgtccaagat  gatgcaggcg  cacattaacc  ccgtgtttga  ccagcggag
2401  gacgggaagg  aagccagcgc  cagagggtgc  aggccatcag  tctctggcgc  tttggacccc
2461  aaggccctgg  tgaaggagga  gcaggccacc  accatcttcc  agtcggagca  gggcaagaag
2521  accatagaca  tctactggct  ctttgacgat  ggaggcctca  ccctcctcat  tccctatctc
2581  cttggccgca  agaggagggtg  gagcaaatgc  aagatccgtg  tgttcgtagg  cggccagatt
2641  aacaggatgg  accaggagag  aaaggcgatc  atttctctgc  tgagcaagtt  ccgactggga
2701  ttccatgaag  tccacatcct  ccctgacatc  aaccagaacc  ctcgggctga  gcacaccaag
2761  aggtttgagg  acatgattgc  acccttccgt  ctgaatgatg  gcttcaagga  tgaggccact
2821  gtcaacgaga  tgcggcgagg  ctgcccctgg  aagatctcag  atgaggagat  tacgaagaac
2881  agagtcaagt  cccttcggca  ggtgaggctg  aatgagattg  tgctggatta  ctcccgagac
2941  gctgctctca  tcgtcatcac  tttgcccata  gggagggaag  ggaagtggcc  cagctcgctg
3001  tacatggcct  ggctggagac  cctgtcccag  gacctcagac  ctccagtcac  cctgatccga
3061  ggaacaccag  aaaacgtgct  caccttttac  tgccagtaac  tccaggcttt  gacatccctg
3121  tccacagctc  t

```

Translation:

MAELPTTETPGDATLCSGRFTISTLLSSDEPSPPAAYDSSHPSH

LTHSSTFCMRTFGYNTIDVVPTYEHYANSTQPGEPKVRPTLADLHSFLKQEGRHLHA
LAFDSRPSHEMTDGLVEGEAGTSSEKNPEEPVRFGWVKGMIRCMLNIWGVILYLRLP
WITAQAGIVLTWIIILLSVTVTSITGLSISAISTNGKVKSGGTYFLISRSLGPELGG
IGLIFAFANAVGVAMHTVGFAETVRDLLQEYGAPIVDPINDIRIIGVVSVTVLLAISL
AGMEWESKAQVLFFLVIMVSFANYLVGTLIPPSKASKGFFSYRADIFVQNLVPDWR
GPDGTFFGMFSIFFPSATGILAGANISGDLKDPAIAIPKGTLMAlFWTTISYLAISAT
IGSCVVRDASGVLNDDTVTPGWGACEGLACSYGWNFTCTQQHSCHYGLINYYQTMSMV
SGFAPLITAGIFGATLSSALACLVSAAKVQCLCEDQLYPLIGFFGKGYGKNKEPVRG
YLLAYAIAVAFIIIAELNTIAPIISNFFLCSYALINFSCFHASITNSPGWRPSFQYYN
KWAALFGAIIISVVIMFLLTWAAALIAIGVVLFLLLYVIYKKPEVNWGSSVQAGSYNLA
LSYSVGLNEVEDHIKNYRPQCLVLTGPPNFRPALVDFVGTFTRNLSLMICGHVLIGPH
KQRMPELQLIANGHTKWLNRKIKAFYSDVIAEDLRRGVQILMQAAGLGRMKPNILVV
GFKKNWQSAHPATVEDYIGILHDAFEFNYGVCVMMREGLNVSKMMQAHINPVFDPAE
DGKEASARGARPSVSGALDPKALVKEEQATTIFQSEQGKKTIDIYWLFDGGLTLLIP
YLLGRKRWSKCKIRVFVGGQINRMDQERKAIISLLSKFRLGFHEVHILPDINQNPRA
EHTKRFEDMIAPFRLNDGFKDEATVNEMRRDCPWKISDEEITKNRVKSLRQVRLNEIV
LDYSRDAALIVITLPIGRKGKCPSSLYMAWLETLSQDLRPPVILIRGNQENVLTFYCQ

8.4 akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die Damen und Herren:

Aumüller, Arnold, Baum, Basler, Bertalanffy, Bien, Czubayko, Doss, Geus, Gotzen, Griss, Habermehl, Happle, Hofmann, Joseph, Klenk, Klose, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Lange, Lennartz, Lorenz, Maisch, Moosdorf, Mueller, Niessing, Oertel, Pfab, Reichert, Remschmidt, Rothmund, Schäfer, Schachtschabel, Schmidt, Seyberth, Slenzka, Sturm, Weihe, Werner, von Wichert.

8.5 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. G. Klaus danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und für sein Vertrauen in eine sachgerechte Umsetzung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. N. Jeck für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit und seine jederzeit gewährten geduldige, unermüdliche Unterstützung, sowie für seine Diskussionsbereitschaft bei Problemen jeglicher Art.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Seyberth, insbesondere Herrn Dr. M. Konrad , Frau Dr. M. Peters und den Laborantinnen Frau Pechmann und Frau Alfen, danke ich für die entspannte, motivierende, sachverständige und humorvolle Arbeitsatmosphäre und für die stete Hilfsbereitschaft beim Bewältigen experimenteller und theoretischer Aufgaben.

Meinen Freunden Carolin Hammerle, Kristina Schrader, Mark Behrendt danke ich recht herzlich für die uneigennütze Hilfestellung in EDV-und Sachfragen und deren motivierenden Einfluss auf diese Arbeit.

Des Weiteren danke ich meinen Freunden in der Hockeyabteilung des VfL Marburg und des SV Darmstadt 98 für die sportlich bereichernden Stunden neben meinem Studiums und der Promotionsarbeit, die Kraft und Motivation für die Fertigstellung der Arbeit lieferten.

Letztendlich gilt das größte Dankeschön meinen Eltern, durch deren unermüdliche Unterstützung ich die Aufgaben des Studiums und der Promotionsarbeit sorgenfrei meistern konnte.

